



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

Ecole Doctorale

Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

THESE

Présentée à l'INPL

par

AICHA DJIDEL

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Sujet

**Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei*
subsp. *rhannosus* sur jus de datte :
Cinétique et optimisation en cultures discontinues,
semi-continues et continues**

Soutenue publiquement le 24 octobre 2007 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président :	M	M. FICK
Rapporteurs :	MM	J.F. CAVIN F. DUCHIRON
Examineurs :	MM	A. AMRANE J. BOUDRANT F. FOURNIER
Invité:	M	N. NANCIB

A la mémoire de mes parents, qui ont béni mon désir d'apprendre et m'ont toujours encouragé, avec tout mon amour et ma reconnaissance pour être devenue ce que je suis,

A mes frères et sœurs, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde tendresse,

A mon mari

A mes filles Sarra et Maya.

Que nabil, et moi-même, puissions transmettre à Maya l'intérêt que nous portons au développement de l'esprit, avec autant d'amour, de patience et de compréhension, qu'ont su faire nos parents.

Que dieu tout puissant illumine le chemin de Sarra

« Celui qui aura fait le poids d'un atome de bien, le verra »

Verset 7, Sourate « le tremblement de terre »

AVANT-PROPOS

Ce travail rentre dans le cadre de l'accord programme N° COMDU 502 du Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective (CMEP) entre la France et l'Algérie. Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire des Sciences du Génie chimique (L.S.G.C), au sein du groupe « Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires » et dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Ferhat Abbas de Sétif.

J'ai une attention toute particulière pour Monsieur Joseph BOUDRANT, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli au sein du groupe GPBA, mais également pour sa direction de recherche inspirée et pour la confiance dont il m'honore.

J'associe à ces remerciements Nabil NANCIB, Professeur à l'Université Ferhat Abbas de Sétif, codirecteur de cette thèse pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté et pour le temps qu'il m'a consacré afin de mener à bien ce travail.

Je remercie Monsieur Michel FICK, Professeur à l'ENSAIA d'avoir accepté d'être Président de ce jury, ainsi que pour les conseils qu'il m'a apporté.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur Jean François CAVIN, Professeur à l'Université de Dijon ainsi qu' à Monsieur Francis DUCHIRON, Professeur à la Faculté des Sciences de Reims, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie Monsieur Abdelatif AMRANE, Professeur à l'Université de Rennes d'avoir accepté de juger ce travail et de participer au jury de thèse.

Je remercie Monsieur Frantz FOURNIER, Maître de Conférences à l'ENSAIA pour l'aide qu'il a su m'apporter notamment dans l'aspect modélisation et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de GPBA pour leur bonne humeur et leur disponibilité.

Enfin, je tiens à remercier :

- ***Ceux qui ont contribué à ce travail : Djalal MEZIANE-CHERIF et Abdelhafid BOUBENDIR.***
- ***Fabrice BLANCHARD, Evelyne RONAT et Bernard PARISET pour leur aide technique.***

- SOMMAIRE GENERAL -

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Synthèse des connaissances	6
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	74
CHAPITRE III : Cultures discontinues	91
1. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	94
2. Lactic acid from date juice extract with single and mixed cultures of <i>Lactobacillus casei</i> and <i>Lactococcus lactis</i>	108
3. Lactic acid production from single and mixed sugars using <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	124
CHAPITRE IV : Cultures semi-continues	137
Optimisation of glucose date juice for the production of lactic acid by <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> in fed batch culture	140
CHAPITRE V : Cultures continues	153
Batch and continuous of lactic acid from date juice by <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	156
CHAPITRE VI : Modélisation	172
Kinetics of batch production of lactic acid from date juice sugars by <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>	175
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	189
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	195
PUBLICATIONS PERSONNELLES	217

INTRODUCTION

Le dattier est le palmier le plus cultivé dans le monde. Originaire du bassin de l'Euphrate, où se sont établies les plus vieilles civilisations de l'Eurasie, le palmier dattier y serait cultivé depuis 6.000 à 8.000 ans, ce qui en ferait un des arbres fruitiers les plus anciennement domestiqués. Il s'est répandu vers l'ouest dans toute l'Afrique du nord et vers l'est jusqu'à l'Inde. Il est très exploité dans l'Afrique méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Asie de l'ouest et les Etats-Unis. Les fruits du palmier dattier sont la principale source de revenus d'une vingtaine de pays de ces régions. Leur exploitation intéresse de nombreux secteurs de leur économie, dont celui de l'alimentation. Les dattes tiennent une large place dans l'alimentation des populations vivant au voisinage du Sahara. Certains affirment même que sans le dattier, l'épanouissement des civilisations sumérienne et babylonienne n'aurait pas été possible, et l'expansion de la race humaine dans les parties arides du vieux monde aurait été moins importante. Le dattier est l'une des rares plantes à pouvoir survivre dans le climat inhospitalier du désert (très chaud le jour, froid la nuit), d'où son importance pour les nomades à qui ces fruits fournissent une source d'énergie concentrée, un kilo de dattes sèches apportant environ 3.000 calories (Vanier, 2005).

Cinquième producteur mondial de dattes, l'Algérie exporte 15.000 tonnes chaque année dans tous les pays du monde, malheureusement à côté d'une production nationale moyenne avoisinant les 300.000 tonnes, une moyenne de 60.000 tonnes constituée par des déchets provenant des palmeraies et des stations de conditionnement est impropre à la consommation en frais. Ces déchets subissent un tri sélectif et la majeure partie (90%) est traitée en vue de la transformation, le plus souvent en pâte de dattes (Ghars). Les 10% restant sont destinés à l'alimentation de bétail dans le but de compenser le déficit et le déséquilibre des régimes alimentaires. Les dattes sont connues pour leur valeur nutritionnelle. Bien qu'elles soient riches en certains sels minéraux (Abou-Zeid *et al.*, 1991), vitamines (Abou-Zeid *et al.*, 1991) et acides organiques (Youssef *et al.*, 1992), c'est surtout leur teneur en sucres qui en fait un aliment de premier choix.

Les dattes, de par leur grande richesse en sucres et leur conservation relativement longue, offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel elles sont soumises. En effet, elles peuvent servir de matière première de fermentation pour la production de divers métabolites tels que l'acide citrique (Abou-Zeid et Khoja, 1993), l'oxytétracycline (Abou-Zeid *et al.*, 1993), l'éthanol (Al Bassam, 2001), les levures de type *Sacharomyces cerevisiae* (Nancib *et al.*, 1997) et la production de

ferments lactiques pour yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) (Nancib *et al.*, 1999).

Cette richesse peu exploitée est une ressource renouvelable qui peut être utilisée en biotechnologie. En effet, la microbiologie industrielle et la biotechnologie impliquent toutes les deux l'emploi des micro-organismes pour atteindre des buts spécifiques, soit pour la fabrication de nouveaux produits à valeur ajoutée marchande, soit pour l'amélioration de l'environnement. La microbiologie industrielle, telle qu'elle s'est traditionnellement développée, se concentre sur des produits comme les composés pharmaceutiques et médicaux, les acides aminés et les acides organiques. Parmi ces bioconversions envisageables, la transformation en acide lactique apparaît prometteuse, vu l'attractivité apparemment décisive qu'a montré ce métabolite ces dernières années notamment en regard de la production de polymères d'acide lactique biodégradables, qui sont utilisés pour des applications à hautes valeurs ajoutées.

La production d'acide lactique par des micro-organismes s'est très bien développée depuis plus d'une dizaine d'années et souvent ce sont des procédés qui utilisent des substrats relativement coûteux (glucose, lactose et extrait de levure). Actuellement, différentes matières premières peu coûteuses servent de sources de carbone pour la production d'acide lactique: c'est le cas des mélasses, du lactosérum, des hydrolysats d'amidon, du blé (et même du bois). En effet, le milieu de culture entre pour une part importante dans le coût de production de biomasse, de métabolites et donc d'acide lactique. Il est donc essentiel de trouver un bon équilibre entre les qualités nutritionnelles et technologiques des matières premières, leur prix et leur disponibilité sur le marché. De ce fait, l'aspect valorisation de sous produits de dattes par les bactéries lactiques pour produire de l'acide lactique, est nouveau.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette optique et porte sur la valorisation de déchets de dattes pour la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*.

Nous commencerons dans le Chapitre I par une revue bibliographique présentant l'essentiel de l'état des connaissances sur d'une part, la datte, sa composition et les différentes voies développées pour sa valorisation et d'autre part, sur l'acide lactique,

tels que son utilisation, les souches microbiennes productrices d'acide lactique, leur métabolisme ainsi que les différents procédés de production d'acide lactique. Le Matériel et Méthodes de cette thèse seront décrits dans le Chapitre II.

Les objectifs de notre travail sont résumés en plusieurs parties et chacune de ces parties sera présentée sous forme de publications ou de projets de publications. Ainsi, nous présentons successivement les chapitres principaux suivant:

III. Cultures discontinues

- 1- Une première partie sera consacrée à l'utilisation du jus de datte en tant que matière première pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. Afin de diminuer les coûts liés à l'ajout de co-substrat, différentes sources azotées économiques seront testées, puis déterminer si une supplémentation en vitamines est nécessaire pour améliorer les performances des fermentations.
- 2- La deuxième partie sera consacrée à l'utilisation de jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production d'acide lactique en culture pure et mixte en utilisant *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Ceci dans le but d'améliorer la production d'acide lactique.
- 3- Dans la troisième partie, nous nous intéresserons à la production de l'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* sur sucres pures et mixtes. Nous étudierons également l'effet des sucres de jus de datte (glucose et fructose) sur la production d'acide lactique. Ceci nous permettra d'obtenir des informations sur le comportement de la souche sur le jus de datte.

IV. Cultures semi-continues

Ce chapitre sera consacré à la mise au point d'une stratégie d'alimentation permettant l'amélioration des performances du procédé en réacteur semi-continu. Pour cela, nous étudierons les effets produits par le débit et la concentration du milieu d'alimentation sur la production d'acide lactique, la consommation du glucose de jus de datte et la croissance bactérienne.

V. Cultures continues

Le premier objectif de ce chapitre est d'utiliser l'extrait bactérien en culture batch comme une alternative économique par rapport à l'extrait de levure utilisé en tant que source d'azote mais qui est relativement onéreux. Le second objectif est d'évaluer les effets de différents taux de dilution en culture continue sur la croissance et la production d'acide lactique. Ceci nous permettra d'étudier le comportement de la souche dans ce mode de culture puis de déterminer le taux de dilution optimal afin d'améliorer les performances de production d'acide lactique.

VI. Modélisation

Dans la cinquième partie, nous développerons un modèle mathématique avec l'objectif de traduire les principaux phénomènes expérimentaux observés et de simuler correctement les cinétiques de culture en mode discontinu.

Enfin, nous terminerons par une conclusion générale concernant l'ensemble de ce travail et permettant de le placer dans la problématique à laquelle il se raccroche et en laissant entrevoir les perspectives aux quelles il pourrait donner lieu.

CHAPITRE I

Synthèse des connaissances

- CHAPITRE I- Synthèse des connaissances

SOMMAIRE

1. LA DATTE	9
1.1. Description botanique	9
1.1.1. Stades de maturité	9
1.2. Répartition des palmiers dattiers	10
1.3. Production de dattes	10
1.4. Le palmier dattier en Algérie	10
1.4.1. Les variétés de dattes	11
1.4.2. Les déchets de dattes	11
1.4.2.1. Les dattes non appréciées	11
1.5. Composition de la datte	12
1.5.1. Les sucres de pulpe de datte	13
1.5.2. Teneur en eau	14
1.5.3. Les protéines	15
1.5.4. Les sels minéraux	16
1.5.5. Les lipides	17
1.5.6. Les acides organiques	18
1.5.7. Les vitamines	18
1.5.8. Autres constituants	19
1.6. Valorisation de la datte	20
1.6.1. Valorisation directe	20
1.6.2. Valorisation indirecte	22
1.6.2.1. Production d'organismes unicellulaires	22
1.6.2.2. Production d'oxytétracycline	23
1.6.2.3. Production d'acide citrique	23
1.6.2.4. Production d'alcool	23
1.6.2.5. Production de vitamine B12	23
2. LES BACTERIES LACTIQUES	24
2.1. Les lactobacilles	24
2.2. Les lactocoques	25
2.3. Les interactions entre les souches de bactéries lactiques	26
2.3.1. Les phénomènes de stimulation	26
2.3.2. Les phénomènes d'antagonisme	27
2.4. Métabolisme des bactéries lactiques	28
2.4.1. Métabolisme carboné	28
2.4.1.1. Mécanismes du transport des sucres	28
2.4.1.1.1. Systèmes de transport actif	28
2.4.1.1.2. Systèmes PEP-PT	28
2.4.1.2. Métabolisme des sucres	32
2.4.1.2.1. Voie homofermentaire ou EMP	32
2.4.1.2.2. Voie hétérofermentaire ou PPC	32
2.4.2. Régulation du métabolisme des sucres	35
2.4.3. Régulation du système de transport des sucres	35
2.4.3.1. Transport préférentiel des sucres	35
2.4.3.2. Exclusion de l'inducteur	36

2.4.3.3. Expulsion de l'inducteur	37
2.4.4. Métabolisme énergétique	39
2.4.5. Métabolisme azoté	40
2.4.5.1. Système de transport DtpT	40
2.4.5.2. Système de transport DtpP	42
2.4.5.3. Système de transport Opp	42
2.4.6. Besoins nutritionnels	42
2.4.6.1. Besoins azotés	42
2.4.6.2. Besoins en vitamines	43
2.4.6.3. Besoins en ions	43
2.4.7. Effet de l'oxygène	44
2.4.8. Influence du pH	45
2.4.9. Influence de la concentration en acide lactique	45
3. L'ACIDE LACTIQUE	47
3.1. Propriétés physicochimiques de l'acide lactique	49
3.2. Production d'acide lactique	49
3.2.1. La voie chimique	49
3.2.2. La voie enzymatique	49
3.2.3. La voie fermentaire	50
3.2.3.1. Micro-organismes producteurs d'acide lactique	50
3.2.3.2. Milieux de culture	55
3.2.3.3. Procédés de fermentation	58
3.2.3.3.1. Réacteurs discontinus	58
3.2.3.3.2. Réacteurs semi-continus	60
3.2.3.3.3. Réacteurs continus	60
4. MODELISATION	63
4.1. Modélisation de la fermentation lactique	63

1. LA DATTE

1.1. Description botanique

Le nom scientifique du palmier-dattier est *Phoenix dactylifera*. C'est une espèce dioïque, monocotylédone, appartenant à la famille des *Palmaceae*, et à la sous famille des *Coryphineae*. La famille des *Palmaceae* compte environ 235 genres et 4000 espèces (Munier, 1973). La datte est une baie, la fleur à trois carpelles dont un seul se développe au moment de la pollinisation. Le fruit est généralement de forme plus ou moins ellipsoïdale. La graine, appelée aussi noyau, est ligneuse et sa couleur va du gris au brun et elle porte un petit embryon. Le palmier dattier est l'arbre des zones arides et semi-arides, il est originaire des pays chauds et humides, mais il a de larges possibilités d'adaptation.

1.1.1. Stades de maturité

Chaque étape de la maturation a été identifiée nominalement, ce qui permet de suivre l'évolution du fruit au cours de son développement. Les expressions utilisées sont celles de la nomenclature irakienne (Munier, 1973; Dowson et Aten, 1973):

- Stade Kimri

Le développement de la datte au stade vert ou kimri se décompose en deux phases: la première est caractérisée par un accroissement rapide du poids et du volume, une accumulation de sucres réducteurs, une augmentation lente mais croissante du total des sucres et des matières solides, une très forte acidité réelle et un taux d'humidité élevé. Les caractéristiques de la seconde phase sont un accroissement moins rapide du poids et du volume, une baisse importante du taux d'accumulation des sucres réducteurs, un ralentissement considérable de la formation des sucres totaux, une légère diminution de l'acidité réelle et un taux d'humidité élevé.

- Stade kalâl

Le passage au stade suivant, ou kalâl, est marqué par un changement de couleur de la peau du fruit qui vire du vert au jaune. A ce stade, l'accroissement du poids est de plus en plus lent, l'accumulation de sucres réducteurs est faible, la proportion de saccharose, de sucres totaux et de matières solides augmente rapidement, l'acidité réelle et le taux d'humidité vont en décroissant. Il convient de noter que c'est au stade kalâl que les dattes, sont plus à saccharose qu'à sucres réducteurs.

- Stade Routab

La datte devient plus ou moins translucide, sa peau passe du jaune au brun. Ce stade est souvent appelé stade de maturation et la datte est considérée comme mûre lorsqu'elle est complètement molle et le saccharose accumulé au stade précédent s'invertit.

- Stade Tamar

Le stade final de la maturation de la datte est appelé tamar. Le fruit a alors perdu beaucoup d'eau et le rapport entre le sucre et l'eau restante est assez élevé pour empêcher la fermentation. Il s'agit d'un stade, comparable à celui du raisin sec ou du pruneau. Dans les variétés dites molles, la pulpe est d'abord molle, puis devient de plus en plus ferme tout en demeurant souple. Dans la plupart des variétés, la peau adhère à la pulpe et se ride à mesure que celle-ci diminue de volume.

La teneur en eau des fruits varie donc avec le degré de maturité (Hussein *et al.*, 1974), mais dépend également du caractère variétal.

1.2. Répartition des palmiers dattiers

Quatre milles ans avant Jésus Christ, les dattes étaient déjà connues et cultivées à des fins commerciales dans la zone qui constitue aujourd'hui le sud de l'Irak. Le palmier dattier est très exploité dans l'Afrique méditerranéenne, le Moyen-Orient, l'Asie de l'ouest et les états unis. C'est la principale source de revenus d'une vingtaine de pays de ces régions.

1.3. Production de dattes

Les principaux pays producteurs du monde sont l'Irak, l'Arabie saoudite, l'Iran, la République Arabe Unie, l'Algérie et le Pakistan.

La production mondiale dépasse 2200 000 tonnes et le nombre des palmiers dattiers compte plus de 93 millions.

1.4. Le palmier dattier en Algérie

Le patrimoine phoenicicole algérien est estimé à 9 millions de palmiers dattiers (Anonyme, 1994). Le potentiel productif en 1987 a été estimé à 183.600 tonnes et en 2006 à 500.000 tonnes. Les palmiers sont essentiellement localisés dans les zones de la partie Sud- Est et Centre sud du pays qui offrent des conditions écologiques nonobstant

les ressources en eau favorable à une exploitation phoenicicole à grande valeur ajoutée grâce à la variété Deglet Nour .

1.4.1. Les variétés de dattes

En Algérie les principales variétés cultivées sont représentées par :

- Deglet Nour: qui est la variété de premier choix, elle représente 47% de la production. C'est une datte excellente au goût exquis, très appréciée sur le marché national et international du fait de son aspect de sa saveur de son onctuosité.
- Les dattes communes: la production est estimée à 53% représentées par trois variétés : Ghars, Degla Beida et Mech Degla.
- Les variétés secondaires: elles comptent plus de 150 variétés dont la majorité est très peu appréciée. Les plus répandues sont: Hamra, Tinnaceur, Tegaza, Tezerzait, et takerbouchet (qui présente un intérêt par sa résistance au bayoudh) (Boughnou, 1988).

1.4.2. Les déchets de dattes

Les dattes qualifiées de perdues sont les dattes qui ne sont pas consommées, soit du fait de leur faibles qualités gustatives, soit du fait de leur texture rébarbative, soit tout simplement parce qu'elles sont altérées. A ceux-ci s'ajoutent les problèmes de conditionnement et de stockage et les problèmes agro-écologiques qui concernent surtout les techniques culturales d'irrigation, et de traitement et les intempéries. (C'est particulièrement au cours de l'entreposage que se produisent et se poursuivent les altérations occasionnées par toute sorte de parasites). A certaines compagnes de récolte, les tonnages de dattes détériorées dépassent les 30% de la production (Estanove, 1990).

1.4.2.1. Les dattes non appréciées

Les dattes non mûres

Martoubah: c'est une datte humide avec une teneur en eau qui dépasse 35 % ce qui la rend très sensible à l'éclatement.

Achef: Dattes vertes ratatinées. Cette altération est due à un manque d'eau ou à un choc mécanique, arrêtant la maturité normale. Sa coloration est claire, la peau étirée avec un aspect de caoutchouc.

Les dattes déformées

Dattes parthénocarpiques

Dattes desséchées

Dattes ridées

Dattes pleines

Les dattes acariées

Le palmier dattier et sa production subissent des attaques et dépréciations dues principalement aux ravageurs suivants:

- Les oiseaux qui blessent les fruits, favorisant ainsi les attaques par les parasites.
- La cochenille blanche (*Parlatoria blanchardi*): les dattes se dessèchent sans atteindre la complète maturité. La maladie est appelée Djarab (Gale).
- Le ver de la datte (*Myelois ceratonia*): sur les fruits mûrs la chenille est localisée entre le noyau et la pulpe à partir de laquelle elle se nourrit. A l'intérieur du fruit, on observe un tissage soyeux très fin où s'accroche des excréments.
- Le boufaroua (*Oligonychus afrasiaticus*): il détruit rapidement l'épiderme des fruits et provoque leur déshydratation. La présence de réseaux soyeux caractérise la présence de ce ravageur.
- Des mortalités dues à une fusariose vasculaire (Bayoudh) causée par un champignon (*Fusarium oxysporum* fsp *albedinis*): la maladie se caractérise par un dessèchement progressif des palmes qui revêtent une coloration blanchâtre.
- Un autre champignon (*Aspergillus phoenicis*) provoque la maladie du charbon. L'épiderme de la datte présente une cavité tapissée d'un feutrage mycélien blanchâtre rempli d'une masse noire pulvérulente.

1.5. Composition de la datte

La datte est constituée de deux parties:

- Une partie comestible représentée par la pulpe (mésocarpe).
- Une partie non comestible qui est le noyau ayant une consistance dure. Le noyau représente 10 à 30% de poids de la datte, il est constitué d'un albumen protégé par une enveloppe cellulosique.

L'analyse de cinq variétés de dattes a montré que les pulpes et noyaux de datte sont constitués d'eau, de sucres de protéines, de matière grasse, de fibres et de cendres (Tableau 1.1, Abou-Zeid *et al.*, 1991). Les sucres représentent les constituants majeurs.

Le pourcentage en sucres totaux dans la pulpe de la datte représente environ 67,5 à 80%.

Tableau 1.1. Constituants de cinq variétés de dattes (Abou-Zeid *et al.*, 1991)

A: Pulpe de datte, (B): Noyau de datte.

Teneurs en g rapportées à 100 g de matière sèche.

Constituants	<i>Lobanah</i>		<i>Moshaxik</i>		<i>Motalabin</i>		<i>Khalas</i>		<i>Barni</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Eau	7,5	7,2	12,1	10,3	10,8	10,4	13,2	11,2	10,2	10,5
Sucres	79,2	36,3	68,4	35,7	67,5	36,4	80,8	38,2	74,4	39,73
Protéines	2,0	3,7	2,1	3,9	2,2	4,1	2,4	4,2	2,4	4,5
Lipides	0,8	9,3	0,7	10,2	0,9	9,7	1,2	8,9	1,1	10,4
Fibres	3,0	-	3,2	-	3,3	-	3,0	-	2,0	-
Cendres	1,9	0,9	1,8	0,9	2,1	0,9	2,0	0,9	2,0	1,1

1.5.1. Les sucres de pulpe de datte

On distingue deux catégories de dattes: celles à saccharose (sucre non réducteur) et celles à sucres réducteurs, et on peut les classer d'après leur consistance, en molles, demi-molles et sèches.

- Les dattes molles (taux d'humidité supérieur ou égale à 30%).
- Les dattes demi-molles (de 20 à 30% d'humidité).
- Les dattes sèches (moins de 20% d'humidité).

La persistance du saccharose après le stade kalâl est manifestement liée au durcissement de la datte. Les dattes molles sont à sucres inverti (fructose, glucose) alors que les dattes sèches sont à saccharose, les dattes demi-molles occupant une position intermédiaire (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2. Composition en sucres de quelques variétés de dattes d’Egypte (Hussein, 1972)

Variétés	Pourcentage du poids à l’état sec (g/100g de matière sèche)		
	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
	Dattes molles		
Amhat	79,85	75,72	4,13
Bint Aischa	78,74	77,35	1,39
Hayany	80,66	80,66	0,00
Saidy	75,47	73,32	2,15
Samany	81,57	77,62	3,95
Zaghloul	80,74	79,54	1,20

	Dattes demi-molles		
Aglany	71,83	44,22	27,61
Amri	78,08	35,56	43,42
	Dattes sèches		
Bartamuda	77,84	32,43	45,50
Balady	72,37	28,22	44,15
Gondeila	79,55	15,55	63,88
Malakabi	74,87	27,39	47,48
Sakkoti	78,73	14,42	64,31

1.5.2. Teneur en eau

Des analyses de la teneur en eau de 5 cultivars de dattes (Bou Skri, Deglet Nour, Mejhool, Thoory et Zahidi) ont été effectuées à différents stades de la maturation des fruits (Booij *et al.*, 1992). Les cultivars étudiés ont montré que la teneur en eau des dattes évolue en fonction de leur stade de maturité: l’humidité décroît des stades verts aux stades mûrs (**Tableau 1.3**). Le pourcentage en composés solides totaux augmente donc plus rapidement à l’approche de la maturité des fruits.

Tableau 1.3. Evolution de la teneur en eau des dattes en fonction de leur qualité et de leur stade de maturité (Booij *et al.*, 1992)

Cultivar	Catégorie des dattes	Humidité (g/100g de matière sèche)	
		Stade Kalal	Stade Mûr
Bou Skri	Molles	58%	34%
Mejhool	Molles	58%	34%
Deglet Nour	Demi-molles	55%	25%
Zahidi	Demi-molles	67%	22%
Thoory	Sèches	60%	17%

1.5.3. Les protéines

Parmi les constituants intéressants de la datte, on peut mentionner encore les protéines, mais la pulpe de la datte n'en renferme qu'une faible quantité. Le taux diffère selon les variétés et surtout selon le stade de maturité, il est en général de l'ordre de 1,75% du poids de la pulpe.

De même, il a été montré que le pourcentage de protéines présent dans les noyaux de datte est plus important que celui de la pulpe (Abou-Zeid *et al.*, 1991). Cependant plusieurs auteurs ont montré l'existence de 16 à 17 acides aminés dans la pulpe et l'hydrolysate de noyaux de datte (Auda *et al.*, 1976; Abou-Zeid *et al.*, 1991; Booij *et al.*, 1993). Les proportions en acides aminés contenus dans les dattes d'Oman sont représentées dans le **Tableau 1.4** par Ahmed *et al.* (1995).

Tableau 1.4. Proportion en acides aminés de différentes variétés de dattes (g/100g de protéines) (Ahmed *et al.*, 1995)

Variétés	Bunaringa	Handhal	Hilali	Khalas	Fardh	Khasab	Barneh	Khuneizy	Zabad
Acides aminés essentiels									
Ile	5,19	4,19	5,16	5,03	5,35	5,33	5,45	5,67	4,85
Leu	8,63	8,70	8,66	8,68	8,74	8,80	8,84	9,32	8,32
Lys	4,19	3,40	3,93	3,76	3,95	3,68	3,55	3,90	3,88
Met	1,61	1,81	1,81	2,09	1,71	2,00	1,50	1,87	1,78
Phe	5,05	5,05	5,11	5,19	5,01	5,27	5,08	5,46	5,07
Tyr	5,54	5,54	5,60	5,69	5,50	5,78	5,55	5,99	5,54
Thr	5,10	5,36	5,35	5,10	5,30	5,02	5,11	5,23	4,59
Val	6,82	8,16	6,90	6,64	7,00	7,17	7,18	6,28	6,45
Acides amines non essentiels									
Arg	3,28	3,30	2,97	4,70	2,90	4,36	3,45	3,30	3,53
His	2,35	1,95	2,07	2,37	2,20	2,44	2,08	2,20	2,10
Ala	5,94	5,86	6,02	5,72	6,00	5,77	5,95	6,67	6,47
Asp	10,67	11,03	11,69	11,11	11,44	11,36	11,13	10,74	11,25
Glu	14,12	13,73	14,26	13,05	13,63	13,25	14,37	12,97	14,09
Gly	6,74	6,77	6,68	6,33	6,50	6,48	6,71	5,89	6,75
Pro	5,94	6,39	6,39	5,79	6,03	6,34	5,84	6,20	6,34
Ser	5,08	5,19	5,42	5,34	5,09	4,95	5,18	5,19	5,41

1.5.4. Les sels minéraux

La teneur en cendres des dattes varie de 1,9 à 4,2% au stade Kalâl et 1,5 à 3,0% au stade Mûr (Sawaya *et al.*, 1983). Le calcium et le phosphore, souvent en déficit dans les aliments, ont été trouvés en quantités relativement importantes dans les dattes, ce qui avait déjà été rapporté par Yousif *et al.* (1982) et Sawaya *et al.* (1983).

Les dattes se caractérisent principalement par une forte teneur en potassium, conférant une prédominance alcaline aux cendres (Booij, 1992). Ces observations confirment celles de Cleveland et Fellers (1932) sur les dattes irakiennes, et de Hass et Bliss (1935) sur le cultivar Deglet Nour.

Abou-Zeid *et al.* (1991), ont montré que l'analyse des cendres de pulpe et noyau de datte contiennent un grand nombre de sels minéraux (Ca, Mg, Sr, Si, Al, Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, P, Na, et K) (**Tableau 1.5**).

Tableau 1.5. Proportion des sels minéraux de cinq variétés de dattes (Abou-Zeid *et al.*, 1991)

(A): pulpe de datte

(B): cendres de noyau de datte

Eléments minéraux	Variétés (mg/100 g de matière sèche)									
	<i>Lobanah</i>		<i>Moshawik</i>		<i>Motalabin</i>		<i>Khalas</i>		<i>Barni</i>	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Ca	66,7	22,0	38,2	23,5	29,2	17,5	70,5	25,5	46,7	22,9
Mg	52,3	57,3	10,6	48,8	23,3	51,1	50,3	74,8	48,0	63,5
Sr	1,6	0,7	0,8	0,6	0,9	0,4	1,3	0,5	1,3	0,2
Si	0,7	0	0,1	0	0,4	0	1,4	0	15,2	0,9
Co	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Al	3,9	5,1	2,2	5,2	2,8	4,2	3,0	5,2	1,2	0,3
Ni	0,5	0,5	0,3	0,5	0,4	1,7	0,1	0,5	0	0
Fe	5,2	6,1	2,5	5,5	3,7	4,7	3,8	5,5	1,1	0,9
Zn	0,2	1,7	0,2	1,7	0,1	1,5	0,1	1,6	0,3	0,8
Cu	0,3	1,7	0,1	1,6	0,1	1,3	0,2	1,1	0,2	0,4
Cr	1,3	1,3	0,6	1,3	0,9	0,9	0,3	1,3	0	0
Pb	0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0
Mn	0,4	0,8	0	0,6	0,1	0,6	0,3	0,9	0,3	0,6
P	48,1	98,7	8,5	70,2	18,1	82,2	46,9	107,5	50,0	10,8
Li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2
Na	2,3	4,0	0,9	3,7	1,3	3,7	4,6	5,4	8,3	10,9
K	922,0	280,5	149,0	236,5	305,1	236,5	330,9	255,5	470,1	412,3

1.5.5. Les lipides

En général les dattes contiennent une faible quantité de lipides qui sont présents dans la pulpe (0,7 à 1,1%) mais en proportion plus élevée dans le noyau (8,9% à 10,4%), (Abou-Zeid *et al.*, 1991).

Des données analytiques sur la composition chimique du noyau de datte montrent qu'il renferme plusieurs acides gras avec une proportion plus importante d'acide oléique et laurique (Devshony *et al.*, 1992).

Tableau 1.6. Composition en acides gras des noyaux de datte (Devshony *et al.*, 1992)

Acides gras	(g/100g d'acides gras totaux)
Acide caprique	0,3
Acide laurique	21,8
Acide myristique	10,9
Acide palmitique	9,6
Acide stéarique	1,5
Acide oléique	42,3
Acide linoléique	13,7

1.5.6. Les acides organiques

Le jus de datte est légèrement acide. Rygg (1948, 1953) rapportent que les dattes mûres se caractérisent par une acidité moins importante avec un pH de 5, mais ils ne se prononcent pas formellement sur le rôle de l'acidité dans les dattes. Ils avancent cependant l'idée qu'une forte acidité est associée à une mauvaise qualité. Youssef *et al.* (1992) ont analysé deux variétés de dattes égyptiennes et ont montré l'existence de 3 acides organiques: malate, citrate, et oxalate.

1.5.7. Les vitamines

Les dattes renferment d'une façon générale des quantités appréciables de vitamines du groupe B, particulièrement B1 et B2 (**Tableau 1.7**) (Patron *et al.*, 1954), et d'acide nicotinique ainsi que de faibles quantités de vitamine C (El Baradi, 1968).

Abou-Zeid *et al.* (1991), ont montré que les dattes contiennent essentiellement les vitamines A et C (**Tableau 1.8**).

Tableau 1.7. Teneur en vitamines des dates cultivées en Arizona (Patron *et al.*, 1954)

	Béta carotène (mg/100 g)	Caroténoïdes totaux (mg/100 g)	Thiamine (B1) (mg/100 g)	Riboflavine (B2) (mg/100 g)
Maximum	0,035	0,45	0,14	0,15
Minimum	0,01	0,12	0,08	0,07
Moyenne de 15 variétés	0,02	0,32	0,10	0,10

Tableau 1.8. Teneur en vitamines A et C des dattes Saoudienne (Abou-Zeid *et al.*, 1991)

Variétés	Vitamine A (UI /100 g de poids frais)	Vitamine C (mg/100 g de poids frais)
Lobanah	18	2,75
Moshawick	41	2,60
Motalabin	46	2,90
Khalas	33	3,20
Barni	69	2,84

1.5.8. Autres constituants

- Cellulose

Dowson et Aten (1963) ont analysé 32 échantillons de dattes de diverses variétés à différents stades de développement et ont montré qu'il existe un résidu solide absolument insoluble et qui se compose principalement de cellulose, la proportion variant de 4,09 à 11,97 % avec une moyenne d'environ 7% (poids du fruit à l'état sec).

- Tanin

Presque toutes les dattes sont astringentes au stade kimri en raison de la présence d'une couche de tanin au niveau de la peau. Le tanin et les substances tannoïdes ont été dosés par Turell (1940) qui ont trouvé 6% (p/p) (du poids à l'état frais).

- Pectine

Rygg (1950) a constaté que du stade kimri au stade routab, la proportion de pectine soluble passe de 2 à 1%, celle de protopectine de 4,5 à environ 1% et celle des substances pectiques totales de 6,5 à 2%.

1.6. Valorisation de la datte

La datte peut se prêter à toutes sortes de préparations industrielles ou artisanales qui permettent d'en étendre sa consommation. En effet, certaines variétés d'intérêt commercial négligeable peuvent être valorisées en vue de la transformation technologique (**Figure 1.1**).

1.6.1. Valorisation directe

- La pâte de datte

Elle se prépare à partir de la pulpe de dattes molles et demi molles. Une fois dénoyautées les dattes sont broyées et pétris jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Cette dernière peut être enrichie en protéines et matières grasses afin de constituer un aliment équilibré pour les populations males nourries.

La pâte de datte, se prête bien au fourrage en couche épaisse entre deux biscuits. Elle peut être également utilisée dans la fabrication des confitures et des gelées (Mikki *et al.*, 1978; Nur *et al.*, 1981; Khatchadourian *et al.*, 1982; Mustapha *et al.*, 1982; Sawaya *et al.*, 1982).

- La farine de datte

Après une légère torréfaction les dattes sont séchées et broyées. On obtient ainsi une farine de couleur claire, d'odeur agréable. Cette poudre nourrissante est une base possible pour toutes sortes d'utilisations, puisqu'elle est facile à transporter et à conserver. Elle est utilisée essentiellement en biscuiterie et en pâtisserie (Sawaya *et al.*, 1982). De même la poudre de noyaux de dattes est un excellent aliment pour le bétail.

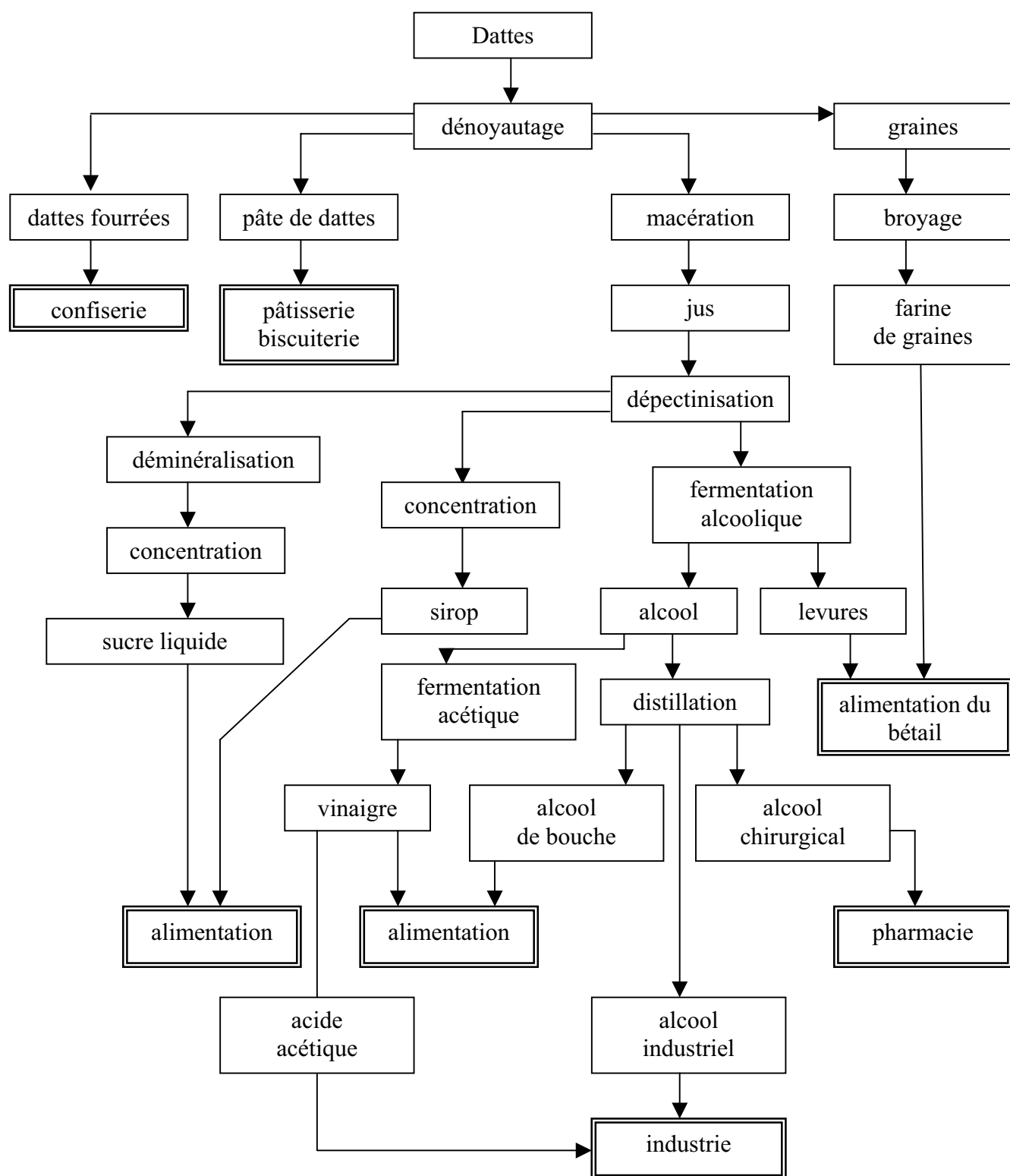


Figure 1.1. Principales transformations de la datte (Estanove, 1990)

- Le sirop de dattes

Les dattes de qualité secondaire, trop molles ou écrasées, peuvent être utilisées pour la fabrication du sirop (Benjamin *et al.*, 1975). Les dattes découpées sont chauffées dans l'eau. On obtient un sirop riche qui peut être filtré et concentré sous vide jusqu'à obtention d'un produit à 65-70% de matière sèche.

Ce produit, bien que d'aspect sombre, est stable et est utilisé comme édulcorant dans de nombreuses préparations pâtisseries et peut également servir comme base à la production de boissons gazeuses (Hamad *et al.*, 1982).

- Le jus de dattes

Le jus de dattes est connu depuis longtemps dans la plupart des pays producteurs de dattes. Ce jus est appelé "Roub" en Algérie et "Debs" en Irak. Seul l'Iraq s'est orienté vers une production industrielle (Dhaia et Passat, 1979). L'extrait est obtenu après épuisement des dattes par l'eau chaude (90°C), pendant une heure. Ce jus peut être acidifié avec quelques grammes d'acide citrique.

1.6.2. Valorisation indirecte

1.6.2.1. Production de protéines d'organismes unicellulaires (POU)

Les dattes peuvent servir comme support à la production de protéines d'organismes unicellulaires. Kamel (1979) et Alemzadeh et Vosoughi (2002) ont essayé d'explorer le jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats obtenus ont montré que les sucres de jus de datte constituent une matière première de base pour la production de protéines d'organismes unicellulaires. La concentration optimale en sucres totaux de jus de datte est de 40 g/l. A cette concentration, 55% de sucres de jus de datte ont été utilisés et la masse cellulaire obtenue après 12 heures de culture est de 4,86 g/l. Cependant, la meilleure production est obtenue lorsque le jus de datte est supplémenté avec 0,25% en $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ et 0,1% en $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$. Pour Jalaluddin *et al.* (1995). La concentration optimale en sucre de jus de datte est de 50 g/l.

Des travaux ont été entrepris par Nancib *et al.* (1997), et ont montré que le jus de datte enrichi en hydrolysats et en cendres de noyaux de datte, constitue un bon milieu de culture pour la production de *Saccharomyces cerevisiae*.

1.6.2.2. Production d'oxytétracycline

Différentes souches productrices d'oxytétracycline ont été utilisées. Les résultats obtenus ont montré que *Streptomyces rimosus* NRRL B-2243 est la plus performante, et que les sucres de pulpe de datte en tant que source de carbone donnent des résultats meilleurs que ceux obtenus avec le glucose. La concentration optimale est de 25 g/l.

L'ajout de 1,5 g/l d'urée en tant que source d'azote et les cendres de noyaux de datte en tant que source minérale permettent d'améliorer la production de l'antibiotique (Abou-Zeid *et al.*, 1993).

1.6.2.3. Production d'acide citrique

Le jus de dattes constitue un bon milieu pour la production d'acide citrique. Abou-Zeid et Khoja (1993), montrent que l'enrichissement du jus de dattes avec l'hydrolysate de noyaux de dattes permet d'améliorer la production à partir de *Yarrowia lipolytica*. Al Obaidi et Berry (1979) obtiennent un rendement de 62% en utilisant un milieu à base de jus de datte déionisé et une culture d'*Aspergillus*.

1.6.2.4. Production d'alcool

La production d'éthanol à partir du jus de datte repose principalement sur l'utilisation de levures. Al Bassam (2001) a utilisé des cellules libres et immobilisées de *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida utilis* en culture batch. Les meilleures performances sont obtenues avec *Saccharomyces cerevisiae*. Un maximum de production de 12,8% (p/v) est obtenu avec les cellules libres et 13,4% (p/v) avec les cellules immobilisées sur l'alginate de sodium.

1.6.2.5. Production de vitamine B12

Le jus de dattes est utilisé comme source de carbone pour la production de la vitamine B12 par *Streptomyces albidoflavus* et *Streptomyces Antibioticus*. Les rendements obtenus sont similaires à ceux obtenus sur d'autres substrats tel que les mélasses (El-Akidi-Hassan, 1982).

2. LES BACTERIES LACTIQUES

Le groupe des bactéries lactiques ou bactéries de l'acide lactique a été défini par Orla-Jensen (1919). Il réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. La fermentation est dite: homolactique si l'acide lactique est pratiquement le seul produit formé et hétérolactique si d'autres composés sont aussi formés: de l'acide acétique, de l'éthanol et de dioxyde de carbone (CO_2). Selon le mode de fermentation obligatoire ou préférentiel, on parle de bactéries homofermentaires ou hétérofermentaires. Dans des conditions de croissance non optimale ou selon la nature du sucre utilisé, certaines bactéries homofermentaires sont aussi capables de fermentation hétérolactique.

Les bactéries lactiques sont en général aérotolérantes. Cependant certains espèces sont anaérobies strictes. Même en présence d'oxygène elles sont incapables de réaliser des phosphorylations oxydatives, ceci est corrélé à leur incapacité de synthétiser les cytochromes et les enzymes à noyau hème. Quelques souches sont capables d'utiliser l'oxygène par l'intermédiaire des systèmes flavoprotéine oxydase, produisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), bien que la plupart ne possèdent pas la catalase et se débarrassent du peroxyde d'hydrogène toxique grâce à des enzymes appelées peroxydases.

2.1. Les lactobacilles

Les espèces de *Lactobacillus* sont caractérisées par des cellules en forme de bâtonnets souvent groupés en chaînes, une forte exigence en facteurs de croissance, en vitamines et en minéraux sous forme ionique (de Roissart et Luquet, 1994; Desmazeaud, 1983; Snell, 1989). Elles sont caractérisées par l'hétérogénéité de la composition de leur ADN: le GC% varie de 32 à 53% (Kandler et Weiss, 1986a). Elles sont considérées comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Originellement elles ont été classées par Orla-Jensen (1919): en trois sous genres: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* et *Betabacterium*. Ce classement avait été fait suivant des critères de température optimale de croissance et de produits de fermentation des sucres. Néanmoins, les travaux de taxonomie moléculaire ont incité Kandler et Weiss (1986b) à abandonner la classification en sous genre tout en maintenant la subdivision en 3 groupes:

Groupe I: anciennement appelé *Thermobacterium*. Ces bactéries ont un métabolisme strictement homofermentaire (ni les pentoses ni le gluconate ne sont fermentés).

Groupe II: anciennement appelé *Streptobacterium*. Ce groupe comprend des espèces à métabolisme homofermentaire facultatif. Les hexoses sont fermentés par la voie d'Emden-Meyerhof en acide lactique, mais les pentoses peuvent être dégradés en empruntant la voie hétérofermentaire avec production d'acide lactique et l'acide acétique par une phosphocétolase inductible. Ces bactéries ont une forte activité fructose 1,6 diphosphate aldolase, une glucose 6-phosphate et une 6-phospho gluconate déshydrogénase. *Lactobacillus casei* est scindé en 4 espèces: *Lactobacillus zeae*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* (Larpent, 2000).

Groupe III: anciennement appelé *Betabactrium*. Ces espèces ont un métabolisme strictement hétérofermentaire. Elles fermentent le gluconate et les pentoses. Elles produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique, du dioxyde de carbone (CO₂) et de l'éthanol. Ces bactéries possèdent une phosphocétolase mais pas d'aldolase.

2.2. Les Lactocoques

Schleifer *et al.* (1985) ont proposé de séparer les streptocoques lactiques mésophiles du genre *Streptococcus* et de créer le genre *Lactococcus*. Par définition, le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable. Ces bactéries sont dépourvues de catalase et ne sont pas capables d'utiliser l'oxygène mais se multiplient en sa présence (anaérobies aérotolérantes). Parmi les *Lactococcus lactis* sp., deux sous espèces et un biovariant prédominant en fermentation laitière: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (*Lactococcus lactis*), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (*Lactococcus cremoris*) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (*Lactococcus diacetylactis*). Le groupe des levains mésophiles, auquel les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Les souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait, à travers leur métabolisme homofermentaire, et à former des arômes. Les espèces de ce genre se distinguent par la présence dans leur enveloppe d'antigène du groupe N, la production d'acide L(+) lactique, une croissance optimale à température moyenne de 20 à 30°C et une température minimale au moins égale à 10°C.

2.3. Les interactions entre les souches de bactéries lactiques

Dans la pratique industrielle, les levains de bactéries lactiques ne sont jamais constitués d'une souche pure, mais de mélanges de souches. Dans ces conditions, des interactions métaboliques se manifestent. Ces interactions sont généralement classées en deux groupes: la stimulation et l'antagonisme.

2.3.1. Les phénomènes de stimulation

Les interactions entre deux populations microbiennes constituent un ensemble complexe de phénomènes biologiques hétérogènes. Boquien *et al.* (1988) ont montré qu'en culture associée, le taux de croissance maximum de *Leuconostocs lactis* était augmenté en présence de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Bellengier *et al.* (1997) montrent au contraire, que le taux de croissance d'une souche de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, en présence d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, est inférieur à celui obtenu dans la culture pure. Enfin, l'exemple classique de protocoopération est l'interaction entre les lactobacilles et les streptocoques thermophiles qui est particulièrement mise à profit pour la fabrication des yaourts. Le rôle stimulant des lactobacilles est obtenu par leur capacité d'hydrolyse des caséines par leur protéase de paroi, ce qui fournit des peptides aux streptocoques thermophiles généralement dépourvus de ce type d'enzyme (Shahbal *et al.*, 1991). En retour les lactobacilles sont stimulés par l'acide formique et le CO₂ produits par les streptocoques (Driessen *et al.*, 1982; Juillard *et al.*, 1988). Certains variants de lactocoques (prt⁻) présentent une déficience dans leur système protéolytique (perte du plasmide codant pour la protéase de paroi) (Law et Haandrikman, 1997) et le système de transport Opp (Yu *et al.*, 1996). Ainsi la perte de plasmide codant pour la protéase de paroi rend les bactéries dites Prt⁻ peu protéolytiques, et entraîne une croissance ralentie des germes et une acidification faible du lait. D'autre part la souche Prt⁻ est stimulée lorsqu'elle est cultivée avec sa souche parentale. Par conséquent le développement du variant Prt⁺ se trouve inhibé par compétition pour les oligopeptides avec le variant Prt⁻ (Juillard et Richard, 1994; Juillard *et al.*, 1996a).

2.3.2. Les phénomènes d'antagonisme

Qui dit association de souches dit possibilités d'interactions. Si ces interactions sont néfastes pour une ou plusieurs souches on parlera d'inhibitions (Juillard *et al.*, 1987). C'est notamment le cas des acides organiques produits par fermentation qui peuvent

agir sur la flore par deux facteurs, parfois difficilement dissociables : l'abaissement du pH et l'action inhibitrice spécifique (Desmazeaud, 1997). L'inhibition peut aussi résulter de la production de peroxyde d'hydrogène car contrairement à d'autres genres bactériens, les bactéries lactiques sont dépourvues de catalase capable de dégrader ce composé toxique (De Roissard et Luquet, 1994; Rodriguez et Manca, 1995). Les bactériocines, produites par quelques souches de bactéries lactiques, sont également des agents antimicrobiens très puissants dont le spectre d'activité peut être plus ou moins large.

Les lactocoques possèdent un système protéolytique capable de dégrader les caséines en acides aminés. Il existe deux types de protéinases les protéines PI et PIII (Geis *et al.*, 1986; Monnet *et al.*, 1987; Visser *et al.*, 1986). En culture mixte la population bactérienne possédant la protéinase de type PIII domine sur le type PI (Flambard *et al.*, 1997). Ce déséquilibre résulterait d'une inhibition de la synthèse de l'enzyme PI ou un phénomène de compétition pour les peptides relâchés par les deux types d'enzyme au niveau du système du transport des oligopeptides (Opp) (Flambard *et al.*, 1997).

Lorsque plusieurs souches sont mises en culture dans un même milieu, elles rentrent nécessairement en compétition si elles utilisent le même substrat. Certains nutriments, présents dans le lait en faibles quantités et indispensables à la croissance bactérienne, peuvent être consommés préférentiellement par un groupe microbien au dépend d'un autre. C'est le cas notamment des matières azotées non protéiques regroupant l'urée, des acides aminés, de courts peptides (Desmazeaud, 1996).

2.4. Métabolisme des bactéries lactiques

2.4.1. Métabolisme carboné

2.4.1.1. Mécanismes du transport des sucres

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

2.4.1.1.1. Systèmes de transport actif

En 1961, Peter Mitchell a proposé une théorie pour expliquer comment le transport des électrons peut être couplé à la génération d'ATP. D'après ce concept chimiosmotique, une enzyme membranaire, l'adénosine 5'-triphosphate-phosphohydrolase, activée par le complexe $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons (2H^+) de la

cellule. Le flux de protons sortant de la cellule crée une différence dans la concentration de protons et la charge électrique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique de la bactérie. Par la suite, en réponse à cette force protomotrice, le sucre peut être assimilé grâce à un gradient de concentration (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

2.4.1.1.2. Systèmes PEP-PT

Les systèmes de translocation de groupe les mieux connus sont les systèmes phosphotransférases, dépendantes du phosphoénolpyruvate (PEP-PT). Trois protéines au moins (EI, HPr, et EII) sont requises pour le transport et la phosphorylation du sucre. Ces protéines forment une chaîne de transporteurs qui prélèvent des groupes phosphate riches en énergie sur le phosphoénolpyruvate et les transfèrent au sucre qui doit pénétrer dans la cellule. Les deux premiers transporteurs sont identiques dans toutes les chaînes PTS; il s'agit de l'enzyme EI et d'une petite protéine thermostable HPr (Heat resistant Protein). L'enzyme I, cytoplasmique est capable de s'autophosphoryler aux dépens du PEP. Suite à cette première réaction, EI catalyse le transfert du groupement phosphate acquis vers la protéine HPr. La phosphorylation de cette dernière a lieu sur l'histidine (Kalbitzer *et al.*, 1982; Weigel *et al.*, 1982). Chez les bactéries à Gram positif et à faible pourcentage en GC%, la protéine HPr peut également être phosphorylée sur la sérine (**Figure 2.1**). Cette réaction est catalysée par une enzyme bifonctionnelle, l'HPr kinase/phosphatase (Kravanja *et al.*, 1999). L'enzyme III cytoplasmique est inductible par le sucre, accepte le radical phosphoryl de l'HPr pour former l'EIIIP. L'EIIIP transfère le radical phosphoryle à l'EII qui effectue la reconnaissance, la liaison, la phosphorylation et la translocation du sucre à travers la membrane de la cellule. Les voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques sont résumées dans les **Figures 2.2 et 2.3**.

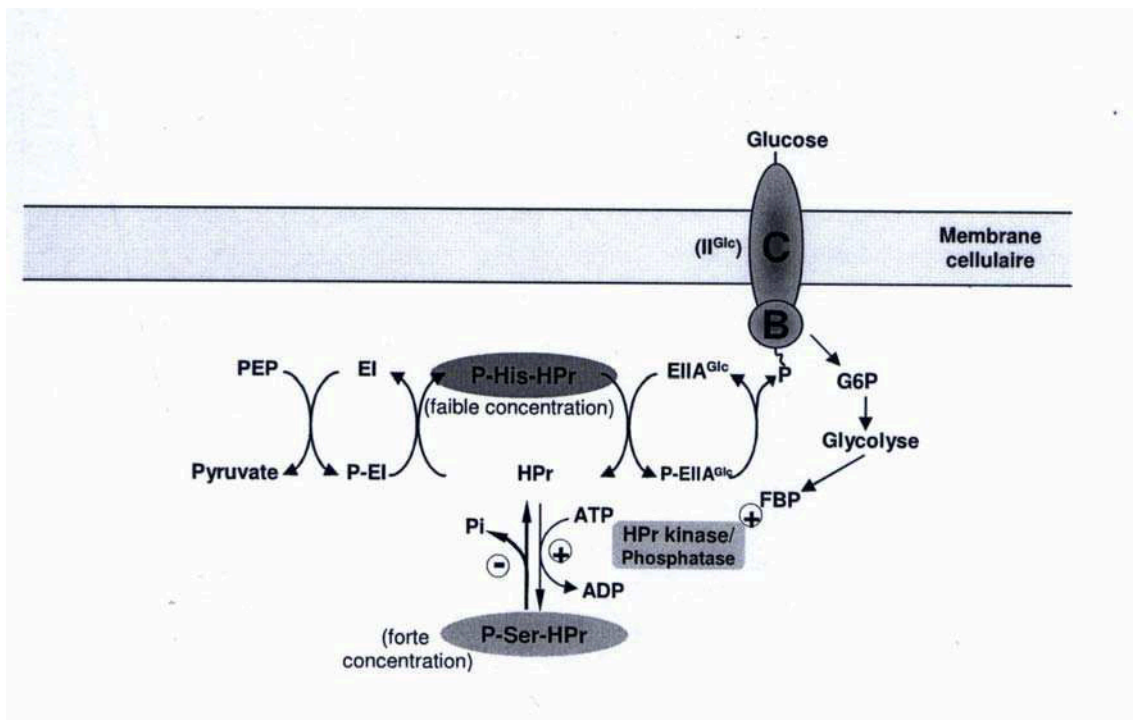


Figure 2.1. Phosphorylations d'HPr, PEP-dépendante par P-EI ou ATP-dépendante par HPrK/P, en présence de glucose (Deutcher *et al.*, 2002)

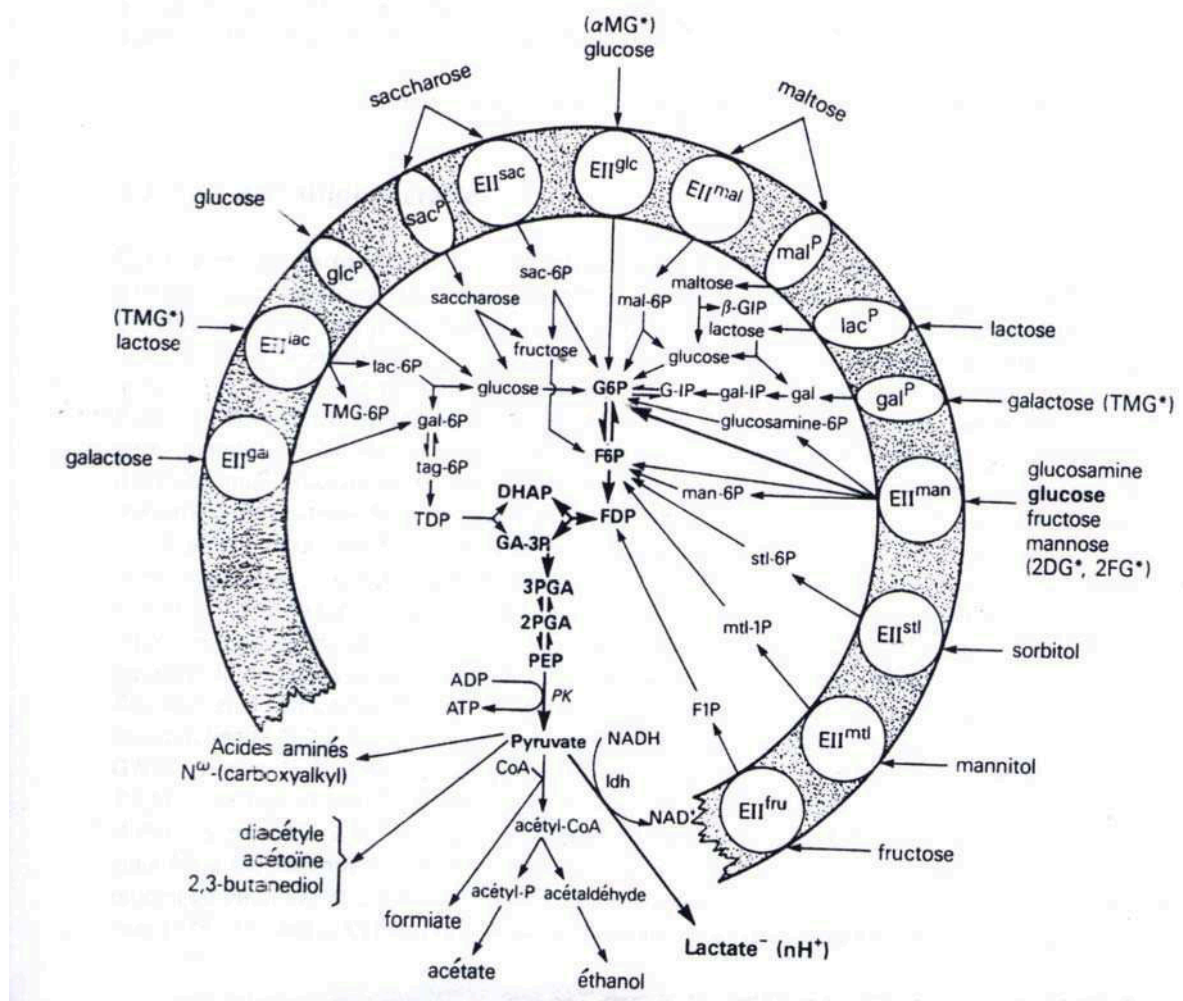


Figure 2.2. Voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

La lettre (p) en exposant désigne les systèmes de transport actif ATP-dépendants (perméase). Le symbole (EII) désigne le composant des systèmes phosphotransférases PEP-dépendants (PEP-PT) localisés dans la membrane et spécifiques des sucres. La voie EMP est en gras.

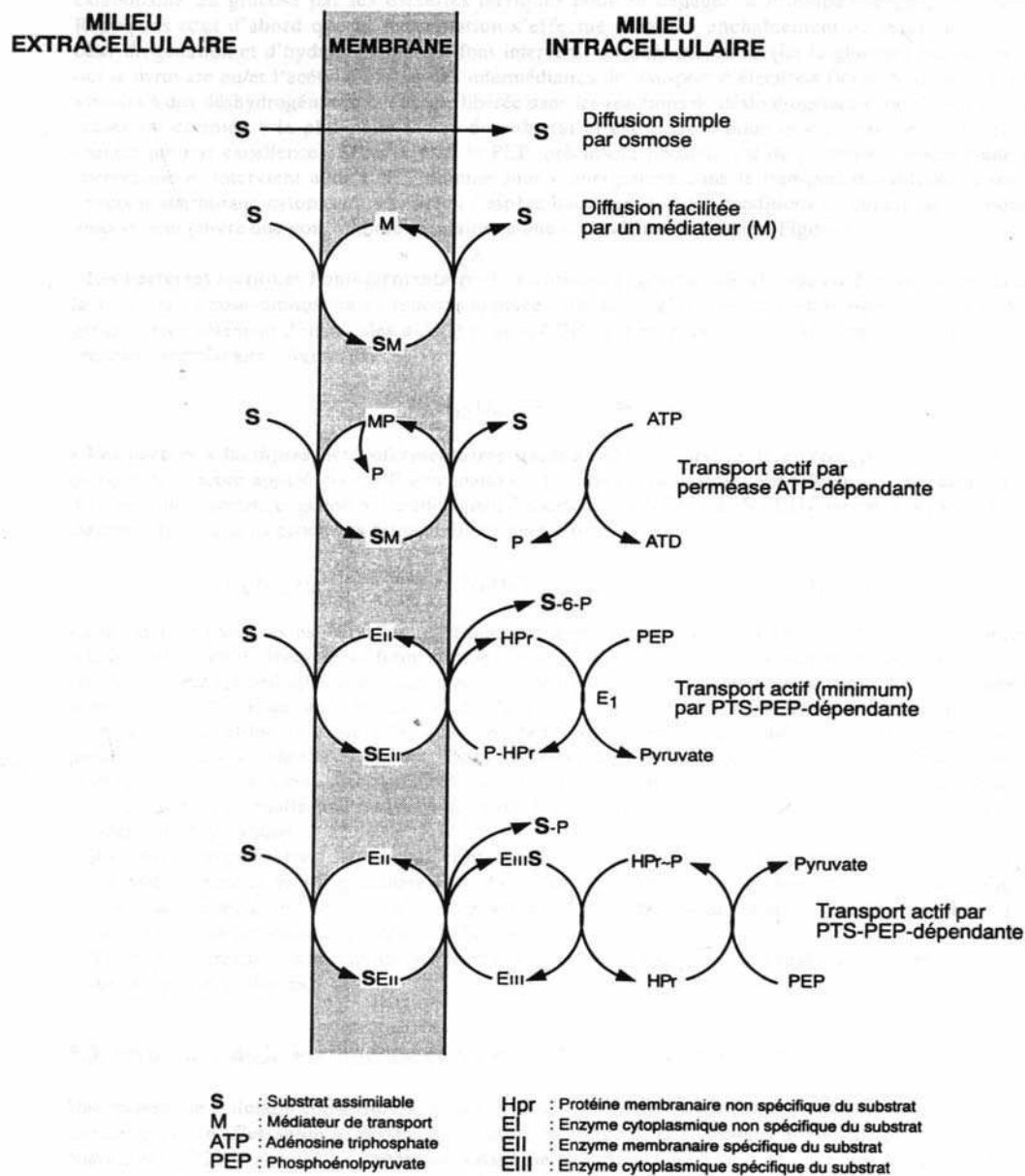


Figure 2.3. Principaux systèmes de transport des substrats à travers la membrane cellulaire (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

2.4.1.2. Métabolisme des sucres

Comme écrit plus haut les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces, homofermentaires ou hétérofermentaires selon la nature, et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation des sucres (**Figure 2.4**).

2.4.1.2.1. Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires, comprenant des espèces de streptocoques, enterocoques, lactocoques, pediocoques et lactobacilles convertissent presque quantitativement le glucose en excès en acide lactique (90-95%). Une des enzymes clé de la glycolyse est la fructose-1,6 diphosphate aldolase. Cette enzyme est présente dans toutes les espèces homofermentaires. C'est une enzyme qui transforme le fructose biphosphate en triose phosphate. Les bactéries homolactiques contiennent habituellement de fortes concentrations de fructose diphosphate (FDP). Cette molécule, importante pour la régulation, sert d'activateur de la synthèse des enzymes terminales de la voie glycolytique (pyruvate kinase et lactate déshydrogénase).

En dehors du glucose, les bactéries homolactiques ont la capacité de fermenter d'autres mono ou disaccharides (**Figure 2.5**). Ces molécules pénètrent dans la cellule par l'intermédiaire de systèmes phosphotransférases ou sous forme libre, par l'intermédiaire d'un système perméase, mais la voie de l'EMP est la voie principale de dégradation des dérivés phosphorylés.

2.4.1.2.2. Voie hétérofermentaire ou PPC (pentose phosphocétolase)

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

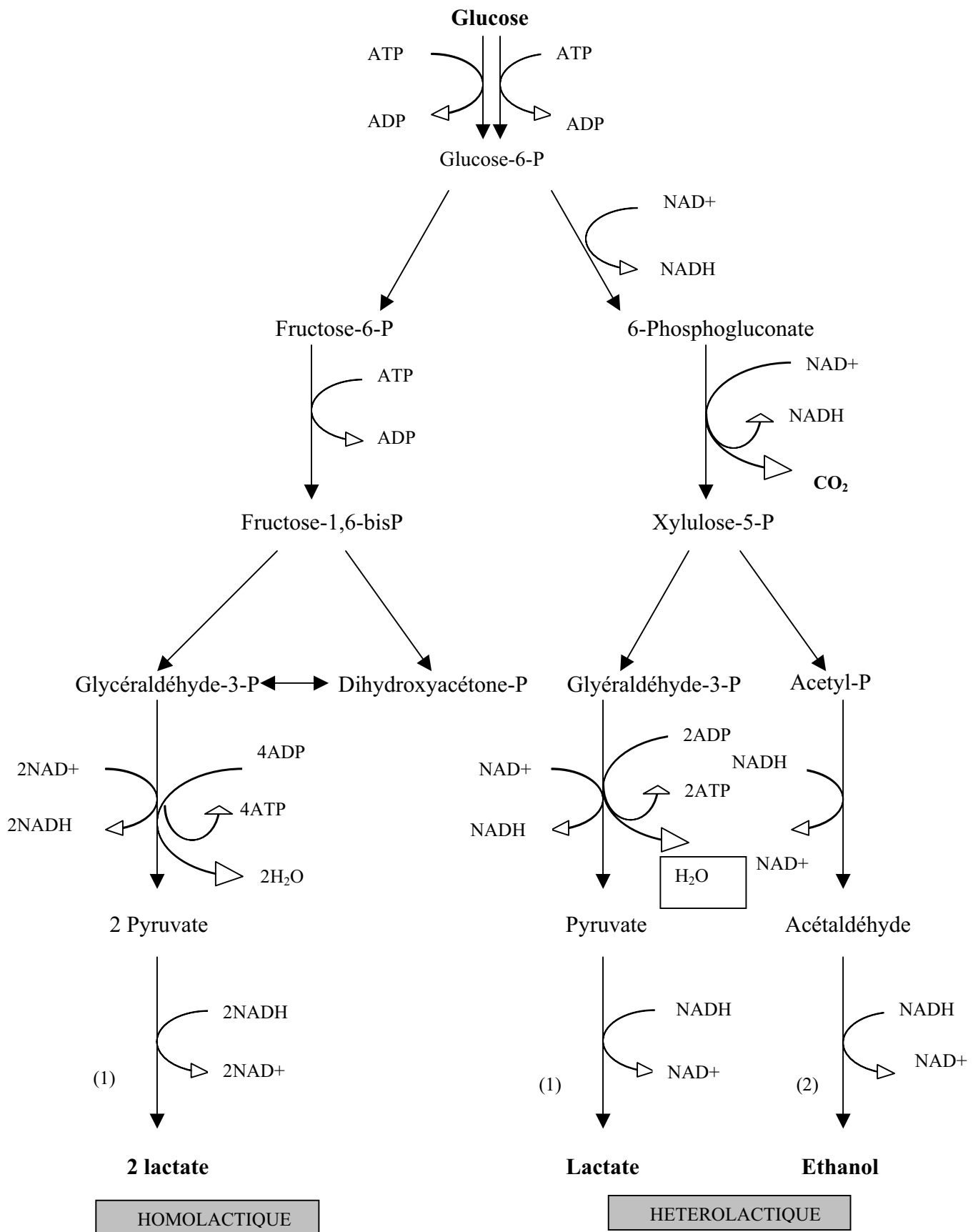


Figure 2.4. Principales voies du métabolisme du glucose par les bactéries lactiques: P, phosphate; ADP, adenosine 5'-diphosphate; ATP, adénosine 5'-triphosphate; NAD⁺, nicotinamide adénine dinucléotide; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide; (1), lactate déshydrogénase; (2), alcool déshydrogénase (Wee *et al.*, 2006a).

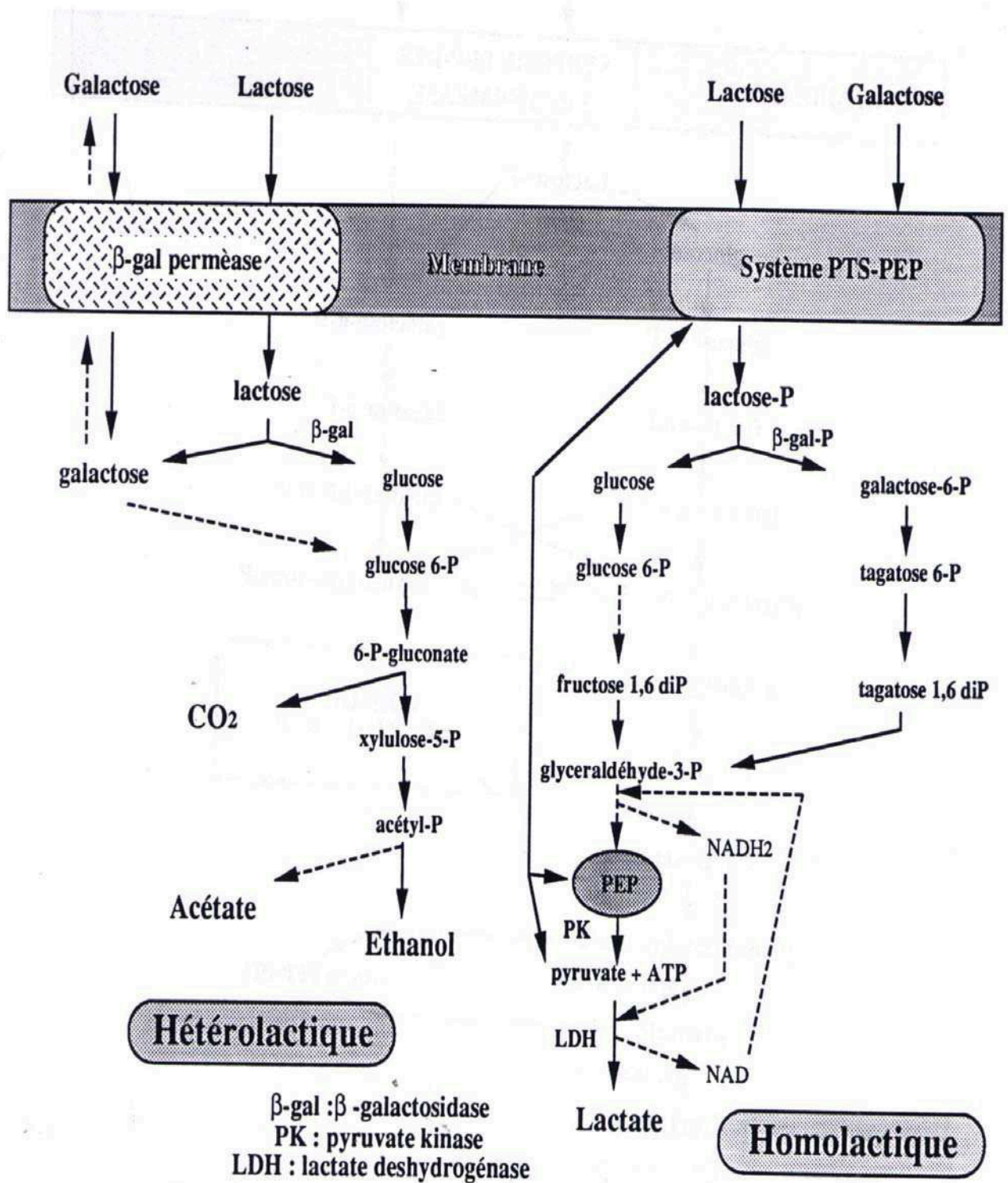


Figure 2.5. Transport et métabolisme du lactose et du galactose chez les bactéries lactiques (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

2.4.2. Régulation du métabolisme des sucres

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments incluant au moins un sucre fermentescible comme donneur d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en 3 étapes :

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

Cette fermentation aboutit principalement à la production d'ATP et d'acide lactique. La dégradation des hexoses est soumise à un mécanisme rapide d'activation-inhibition des enzymes allostériques dont le rôle est important pendant la croissance bactérienne. Ainsi la conversion du phosphoénolpyruvate (PEP) en lactate fait intervenir deux enzymes allostériques: la pyruvate kinase (PK) et la lactate déshydrogénase (LDH) (toutes deux stimulées par le fructose-1-6-diphosphate) (Crow et Pritchard, 1976 et 1977). Le PEP constitue non seulement une étape de la chaîne glycolytique, mais intervient aussi dans le transport des sucres à travers la membrane. Or il a été constaté que, lorsqu'une bactérie lactique est soumise à une carence en sucre, la teneur en PEP croît notablement (inhibition de la pyruvate kinase), tandis que les intermédiaires métaboliques qui stimulent la PK décroissent (Poolman *et al.*, 1987; Otto *et al.*, 1985). Dans ces conditions, la dégradation se ralentit mais produit assez d'ATP pour entretenir la vie cellulaire et la concentration élevée en PEP permet la reprise du transport du sucre dès que celui-ci est à nouveau disponible (Thomas, 1976 ; Thompson et Thomas, 1977).

2.4.3. Régulation du système de transport des sucres

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

2.4.3.1. Transport préférentiel des sucres

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

(FDP) et en ATP (Thompson et Torchia, 1984; Neves *et al.*, 1999; Mijakovic *et al.*, 2002); l'HPK/P, stimulée par ces effecteurs, va phosphoryler l'HPr de façon ATP-dépendante sur la sérine (Galinier *et al.*, 1997; Galinier *et al.*, 1998; Reizer *et al.*, 1998; Jault *et al.*, 2000; Ramstrom *et al.*, 2003). Lors d'études concernant le transport des sucres pour de cellules au repos de *Lactococcus lactis* ML₃, Thompson *et al.* (1978) ont montré que dans un mélange de sucres métabolisables (glucose, galactose et lactose) et d'analogues non métabolisables (2-désoxy-glucose: 2DG et le méthyl- β -D-thyogalactopyranoside: TMG) la souche transporte de préférence le glucose et son analogue. Ce transport préférentiel a été attribué (1) à la compétition entre les différentes enzymes II (EII) pour le donneur commun de phosphoryles, l'HPr-P, (2) à la compétition entre les substrats (lactose et TMG) pour EII^{lac} commune.

2.4.3.2. Exclusion de l'inducteur

De manière générale, on peut distinguer deux facettes dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme du carbone. Le mécanisme global de la répression/activation catabolique qui permet d'une part de réprimer l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone non préférentielles en présence de sucre rapidement métabolisable comme le glucose (Luesink *et al.*, 1998) et d'autre part, à l'opposé, de stimuler l'expression des gènes impliqués dans l'utilisation de ces sources préférées de carbone et d'énergie. En présence d'un mélange de glucose, lactose et galactose, les cellules de *Lactococcus lactis* ML₃ co-métabolisent le glucose et le lactose, mais le galactose n'est consommé qu'après épuisement des sucres précédents (Thompson *et al.*, 1978). Liberman et Bleiweiss (1984) ont décrit lors de la croissance en présence de glucose et de lactose dans le milieu de culture, des profils de croissance diauxiques, ainsi qu'un métabolisme sélectif du glucose par rapport au lactose pour plusieurs espèces bactériennes. L'utilisation préférentielle du glucose est une conséquence de l'exclusion des molécules non préférentielles de la cellule (**Figure 2.6**) (Saier et Crasnier, 1996). Chez *Lactococcus lactis* la protéine HPr-sérine interagit avec la perméase PTS spécifique du lactose pour inhiber son activité (Ye *et al.*, 1994b). On peut citer aussi l'exemple de l'inhibition du maltose chez *Lactobacillus casei* (Dossonet *et al.*, 2000; Viana et Monedero, 2000), ou encore l'accumulation de galactose dans différents milieux de culture et qui est due à la fermentation incomplète du lactose par *Streptococcus thermophilus* (Hutkins *et al.*, 1985). Contrairement à l'idée qui a longtemps prévalu, l'incapacité de cette souche à métaboliser le galactose n'est pas due à l'absence de l'information génétique requise pour la synthèse des voies cataboliques

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

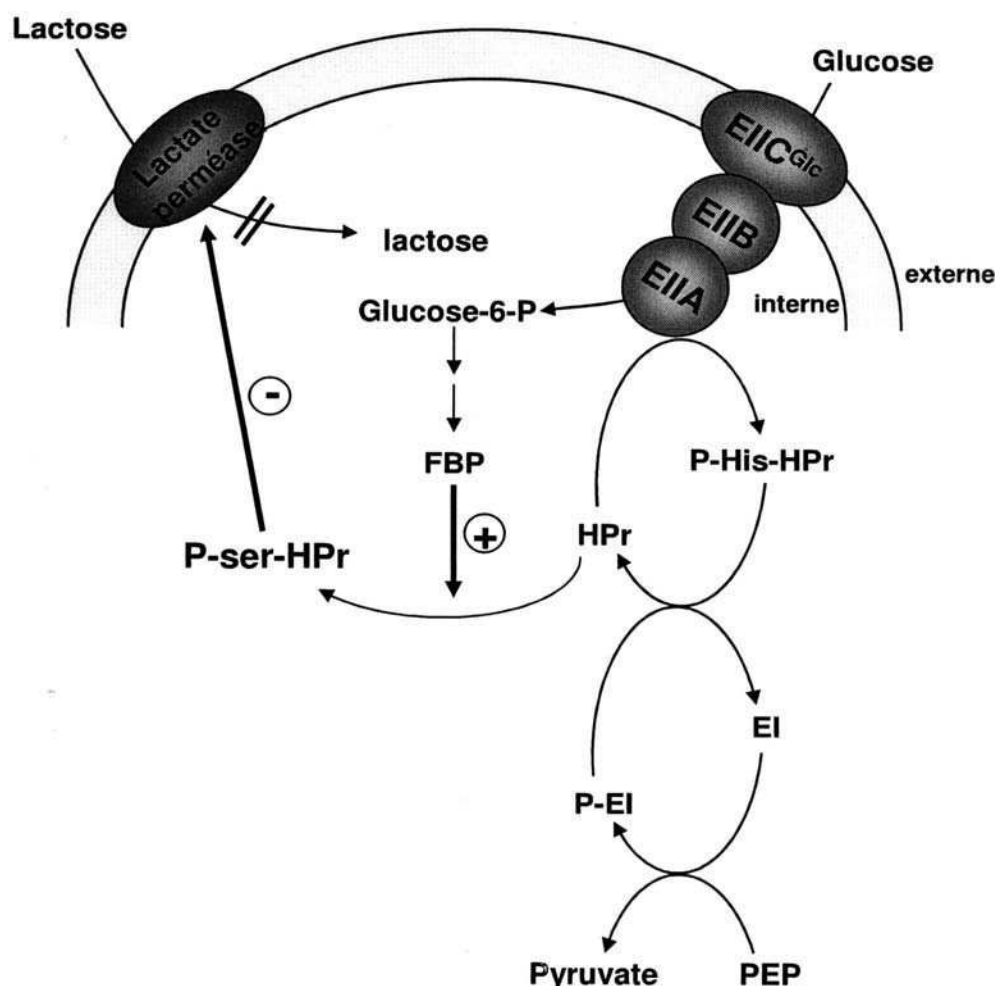


Figure 2.6. Modèle d'exclusion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif. (Saier et Crasnier, 1996).

2.4.3.3. Expulsion de l'inducteur

Il s'agit du mécanisme par lequel l'ajout d'un sucre rapidement métabolisable dans le milieu de culture conduit à l'expulsion des autres sucres préalablement accumulés dans le cytoplasme (Reizer et Panos, 1980; Thompson et Saier, 1981; Luesink *et al.*, 1998). Chez *Lactococcus lactis* le méthyle- β -D-thyogalactopyranoside (TMG) est accumulé dans la cellule sous forme phosphorylée (TMG-6P). Mais l'ajout d'un sucre rapidement

métabolisé provoque une expulsion du TMG sous forme déphosphorylée (Thompson et Saier, 1981). Ainsi en présence de glucose, HPr se trouve majoritairement sous la forme HPr-Ser-P (Deutcher et Saier, 1983; Deutcher *et al.*, 1986). Celle-ci stimule l'activité d'une hexose-phosphate-phosphohydrolase qui va alors déphosphoryler le sucre phosphate pour permettre son expulsion hors de la cellule (Reizer *et al.*, 1983; Thompson et Chassy, 1983). Le **Figure 2.7** illustre ce mécanisme.

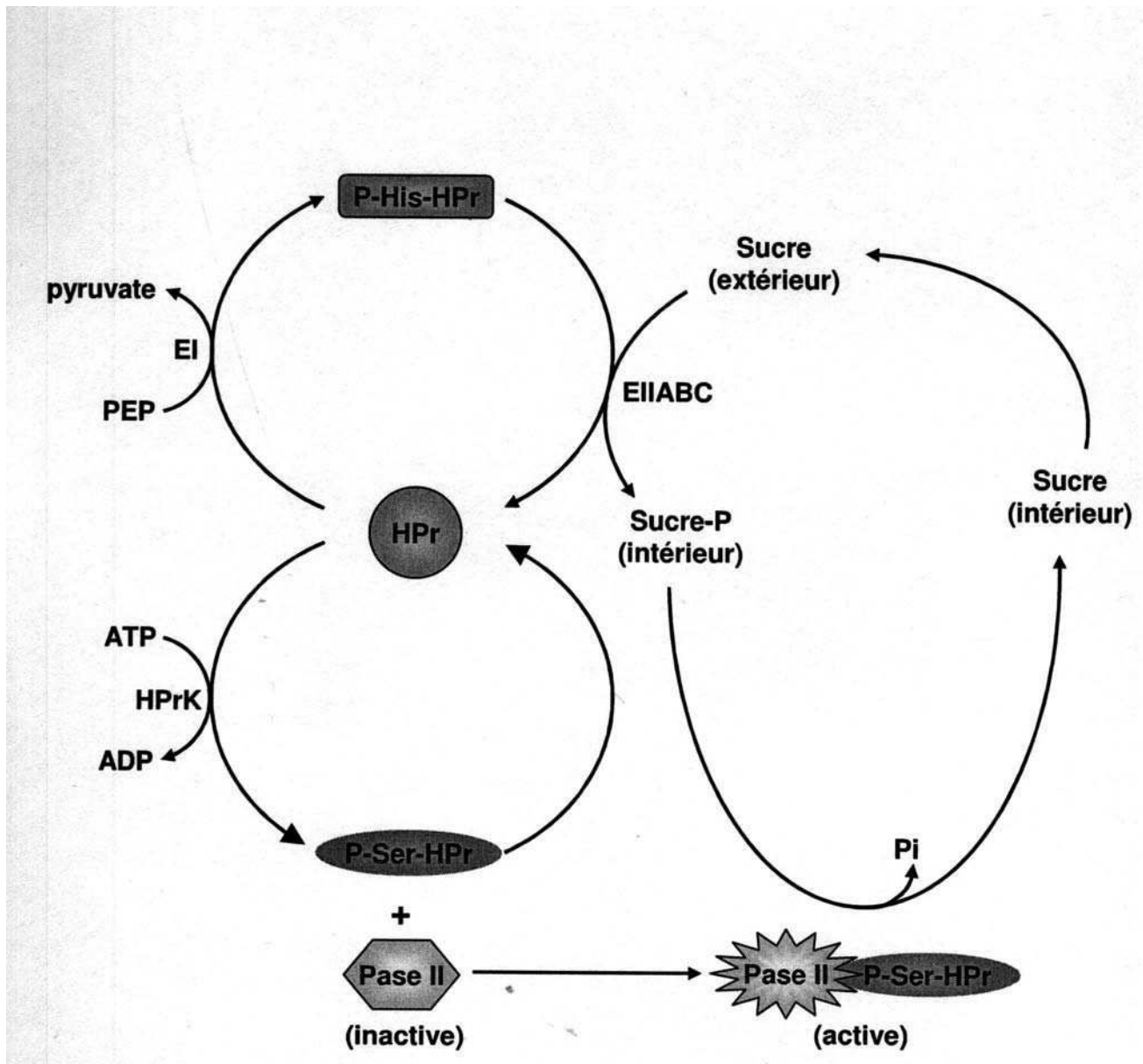


Figure 2.7. Modèle du mécanisme d'expulsion de l'inducteur chez les bactéries à Gram positif (Saier et Crasnier, 1996)

2.4.4. Métabolisme énergétique

Les bactéries lactiques tirent leur énergie de la dégradation des sucres. Deux processus interviennent essentiellement pour générer l'énergie métabolique. D'une part celui couplé à la phosphorylation du substrat, d'autre part celui résultant de phénomènes chimiosmotiques générateurs de forces protomotrices (pmf) (**Figure 2.8**). Le métabolisme des sucres génère des molécules phosphorylées riches en énergie (ATP et PEP), nécessaires au transport des substrats, à l'initiation du catabolisme et aux synthèses cellulaires. Au cours du catabolisme, l'oxydation progressive des sucres est accompagnée de la réduction du NAD régénéré par les déshydrogénases qui transforment le pyruvate en lactate et l'acetyl-CoA en éthanol ou en acétate. Les bilans énergétiques en anaérobiose sont:

Fermentation homolactique:



Fermentation hétérolactique :

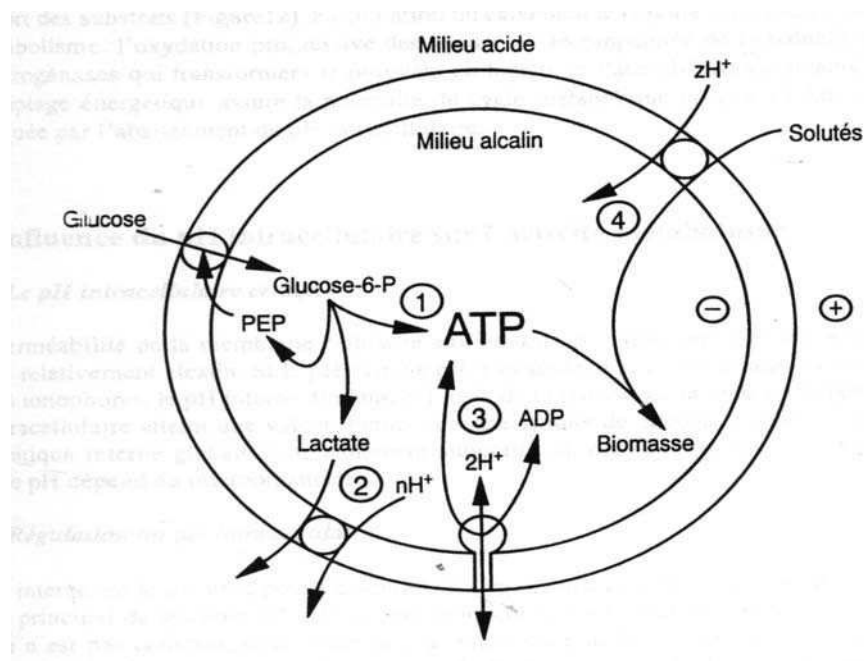
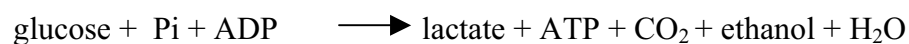


Figure 2.8. Processus de synthèse et d'utilisation de l'énergie chez les bactéries lactiques (Koning et Otto, 1983)

- (1) Synthèse d'ATP à partir du substrat
- (2) Couplage de la sortie des ions H^+ avec la sortie d'ions lactate (2H^+ par lactate)
- (3) Couplage de la sortie ou l'entrée de protons avec consommation ou production d'ATP
- (4) Couplage de l'entrée de soluté avec l'entrée de protons

2.4.5. Métabolisme azoté

Les bactéries lactiques sont très exigeantes en nutriments azotés. Un apport exogène d'acides aminés et de peptides de bas poids moléculaire a un effet stimulant sur la croissance et sur la production d'acide lactique. Les systèmes protéiques des lactocoques et des lactobacilles sont remarquablement similaires, en ce qui concerne leurs composants et leurs mode d'action (Kunji *et al.*, 1996). Ces systèmes comportent des protéases extracellulaires, des systèmes de transport spécifiques pour les di et tripeptides et les oligopeptides et une multitude de peptidases intracellulaires. Les études biochimiques et génétiques du système protéolytique des bactéries lactiques jusqu'ici entreprises, ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus*. Chez *Lactococcus lactis*, il existerait trois transports spécifiques d'oligopeptides allant de 3 à 18 résidus en plus du système couplé à la force protomotrice (**Figure 2.9**) (Desmazeaud, 1998).

2.4.5.1. Système de transport DtpT

Ce système est spécifique pour les di et tripeptides hydrophiles. L'utilisation de ces peptides se présente comme un processus en deux étapes. Dans une première étape, les peptides subissent une translocation à travers la membrane cytoplasmique. Dans une deuxième étape, ces peptides sont soumis à une hydrolyse par des peptidases intracellulaire (Smid *et al.*, 1989). Le système DtpT possède une spécificité large, en effet il présente une affinité pour les peptides monoanionique, dianioniques et amphotères. Il semble avoir également une affinité à l'égard des peptides contenant la proline. Ces derniers ont un effet stimulant de la croissance de *Lactococcus lactis* (Smid et Konings, 1990). Pour les lactocoques les peptides contenant la proline constituent un apport nutritionnel important.

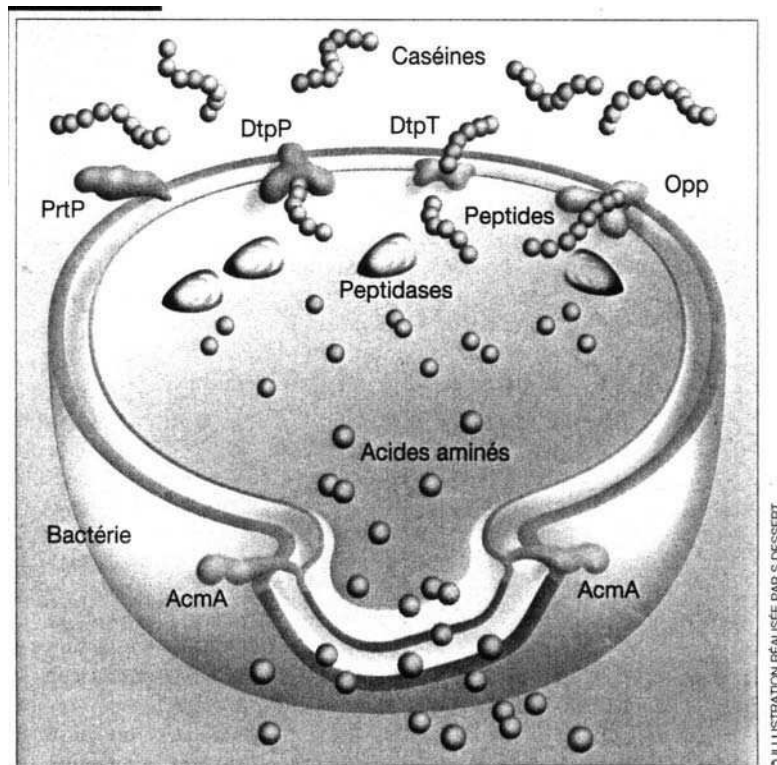


Figure 2.9. Le système protéolytique des lactocoques (Desmazeaud, 1998).

Une protéase extracellulaire (PrtP) dégrade les caséines en gros peptides qui sont « intégrés » par la bactérie grâce à des perméases (DtpP, DtpT, Opp). Là, des peptidases hydrolysent ces peptides en acides aminés qui sont utilisés comme nutriment par la bactérie et sont une source d'arômes. L'AcmA (N-acetylmuramidase A) est une protéine impliquée dans la lyse des bactéries lactiques.

2.4.5.2 Système de transport DtpP

Ce système transporte spécifiquement les di et tripeptides hydrophobes (Foucaud *et al.*, 1995). L'inactivation de l'un ou l'autre des systèmes de transport (DtpT ou DtpP) n'affecte pas le niveau cellulaire en fin de culture, toutefois, lorsque les deux systèmes sont inactifs, le taux de croissance est plus faible. Ces résultats montrent qu'il existe entre les deux systèmes un large recouvrement de spécificité (Juillard *et al.*, 1996b).

2.4.5.3. Système de transport Opp

Ce système de transport est spécifique pour les oligopeptides. Il est couplé à l'hydrolyse de l'ATP (Kunji *et al.*, 1993). Les cinq sous unités de ce système incluent une protéine de fixation des oligopeptides OppA, deux protéines hydrophobes transmembranaires OppB et C deux protéines de fixation de l'ATP OppD et F. Ce système est chargé du transport de peptides contenant de quatre à huit résidus (Tynkkynen *et al.*, 1993).

Koning *et al.* (1989) ont décrit trois mécanismes de transport des acides aminés :

- Le transport couplé à la force protomotrice.
- Le transport actif dont l'énergie est fourni par l'ATP.
- Le transport par système antiport où la force motrice est due au gradient chimique des acides aminés transportés.

2.4.6. Besoins nutritionnels

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont très exigeantes au point de vue nutritionnel. Elles requièrent, pour leur croissance non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments (Marshall *et al.*, 1984).

2.4.6.1. Besoins azotés

En général les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés à partir d'une source d'azote simple, et doivent faire appel à des sources exogènes pour assurer le métabolisme.

Six acides aminés sont essentiels à la croissance des bactéries lactiques soient: l'acide glutamique, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine et l'histidine (Marshall et Law, 1984; Thomas et Pritchard, 1987; Coccagn-Bousquet *et al.*, 1995). La plupart des autres acides aminés sont non essentiels, mais stimulent leur croissance, c'est le cas pour la phénylalanine et la proline (Monnet et Gripon, 1994). Les acides aminés peuvent être sous forme de peptides, d'ailleurs Payne (1980) a montré que l'utilisation

des acides aminés provenant des peptides est généralement plus efficace que celle des acides aminés libres.

2.4.6.2. Besoins en vitamines

Les vitamines jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire. Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser des vitamines (Desmazeaud et De Roissart, 1994), d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture. Les besoins vitaminiques des lactobacilles et des lactocoques sont plus complexes. Toutes les espèces ont un besoin absolu en pantothénate de calcium, en niacine, en riboflavine et en biotine (**Tableau 2.1**). Il faut noter qu'un apport en tween 80 peut supprimer les besoins en biotine (Ledesma *et al.*, 1977).

2.4.6.3. Besoins en ions

Peu de travaux ont été réalisés sur l'influence des minéraux (Boyaval, 1989). Il a été montré cependant, que les ions Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mo^{4+} , Se^{4+} interviennent dans la nutrition des lactocoques (Reiter et Moller-Madsen, 1963) et les ions Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} dans la nutrition des lactobacilles (Deman *et al.*, 1960; Ledesma *et al.*, 1977; Tuli *et al.*, 1985).

Le magnésium stimule la croissance des bactéries lactiques et la production d'acide lactique. Amouzou *et al.* (1985) ont montré le rôle de Mg^{2+} sur *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. La forme ionisée entraîne une activation de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres. Il intervient aussi comme activateur d'un grand nombre de réactions enzymatiques du métabolisme et comme stabilisateur de la structure des acides nucléiques et de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire.

Le manganèse est nécessaire à l'activité de nombreux enzymes dont l'ARN polymérase, la LDH, la NADH oxydase (Archibald, 1986).

Les effets biologiques du manganèse sont associés à trois fonctions :

- à la structure et au fonctionnement des enzymes en tant que coenzyme;
- à la détoxification des cellules mises en présence d'oxygène. Mn^{2+} se substituerait à la superoxyde dismutase pour évacuer les radicaux superoxyde;
- à la stabilisation des organites cellulaires, en particulier Mn^{2+} stabilise la conformation native des ribosomes, la membrane et la paroi bactérienne.

Le calcium est souvent cité par son rôle dans la paroi cellulaire en particulier pour l'activité des protéases de paroi. Thomas et Pritchard (1987) ont montré que des sérine-protéases de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sont activées par le Ca^{2+} . Cette propriété

est attribuée soit à la fixation de l'enzyme sur la paroi, soit à la stabilisation de son activité, soit à la modification de la structure de la paroi.

Tableau 2.1. Les exigences vitaminiques pour *Lactobacillus* sp. et *Lactococcus* ssp. *lactis*

Vitamines	<i>Lactobacillus</i> sp. (Desmazeaud et de Roissart, 1994)	<i>Lactococcus</i> ssp. <i>lactis</i> (Marshall et Law, 1984)
B12	+/-	+
Biotine	+	+
Niacine	+	+
Pantothénate	+	+
Riboflavine	+	+
Thiamine	-	+
Pyridoxal	+	+
Acide folique	+/-	+

2.4.7. Effet de l'oxygène

Les bactéries lactiques sont aérotolérantes. Bien que ne possédant pas de catalase, ces dernières possèdent leur propre moyen de défense contre l'effet toxique de l'eau oxygénée. En général ces bactéries possèdent toutes des peroxydases qui utilisent du NADH_2 comme réducteur et élimine ainsi l'eau oxygénée toxique, ou une superoxyde dismutase à Mn qui catalyse l'élimination des radicaux libres d'oxygènes (**Figure 2.10**). Sur un plan positif, l'oxygène peut accepter des électrons par exemple en provenance du NADH , H^+ et permettre ainsi de régénérer le NAD^+ . Les enzymes responsables de cette réaction d'oxydoréduction peuvent être la NADH , H^+ : H_2O_2 oxydase catalysant la réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (Anders *et al.*, 1970) ou le NADH , H^+ : H_2O oxydase catalysant la réduction de l'oxygène en eau (Bruhn et Collins, 1970). Ces deux enzymes entrent en compétition avec la LDH pour la régénération du NAD^+ . De plus, Smart et Thomas (1987) ont noté une diminution de l'activité spécifique de la LDH en présence de l'oxygène.

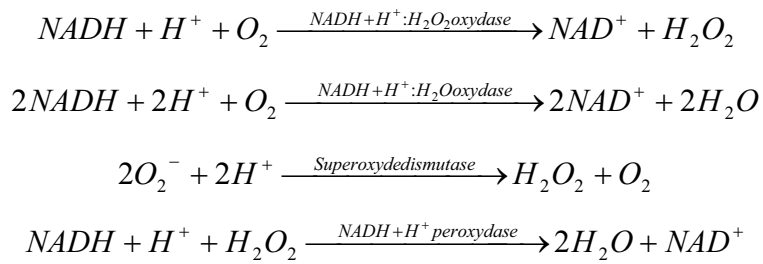


Figure 2.10. Utilisation de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène chez les bactéries lactiques (Desmazeaud et de Roissart, 1994)

2.4.8. Influence du pH

La cinétique des réactions enzymatiques et, par conséquent celle du métabolisme cellulaire, est aussi fortement influencée par le pH. Le pH intracellulaire n'est pas constant et les bactéries lactiques tolèrent facilement des variations importantes de leur concentration intracellulaire en protons. L'imperméabilité de la membrane cellulaire aux protons et aux ions est indispensable pour maintenir l'intégrité de la cellule. Un système H^+ -ATPase permet de réguler le pH interne des cellules. Ainsi si le cytoplasme a un pH supérieur à 8, la pompe à protons se ralentit et le pH interne diminue. Inversement si le cytoplasme a un pH inférieur à 8, la pompe à protons s'accélère et le pH interne augmente. Si le pH externe est trop acide et si la membrane est rendue perméable aux protons, le pH interne diminue ce qui provoque l'arrêt de la croissance et du métabolisme. Ce pH est appelé pH critique. Chez les lactobacilles la valeur critique du pH est de 4, et le pH optimal de croissance se situe selon les espèces entre 4,5 et 6,4 (Kandler et Weiss, 1986a).

2.4.9. Influence de la concentration en acide lactique

L'acidification du cytoplasme résulte de l'accumulation intracellulaire de l'acide lactique produit par fermentation. En présence de fortes concentrations d'acide lactique les cellules ne sont plus en mesure d'expulser des protons (H^+) assez rapidement pour alcaliniser le cytoplasme (Desmazeaud et de Roissart, 1994).

Lorsque la concentration en acide lactique augmente, la croissance bactérienne ralentit jusqu'à s'annuler. L'effet inhibiteur de l'acide lactique s'explique par une consommation accrue d'énergie pour maintenir la force proton-motrice qui assure les échanges avec le milieu extérieur et la stabilité du pH interne des cellules (Cook et Russell, 1994; Brink et konings, 1982; Brink *et al.*, 1985). Des travaux ont montré que le pH influençait la vitesse de croissance des bactéries et que la concentration en lactate

non dissocié influençait les rendements de conversion du substrat en biomasse et en produit, la vitesse de croissance et la productivité (Giraud *et al.*, 1991; Gätje et Gottchalk, 1991; Gonçalves *et al.*, 1991) (**Tableaux 2.2 et 2.3**).

Tableau 2.2. Influence du pH sur le taux de croissance, les rendements et la productivité de *Lactobacillus plantarum* (Giraud *et al.*, 1991)

pH	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Productivité (g/l.h)
4,0	0,19	0,27	0,74	0,29
5,0	0,46	0,25	0,70	0,77
6,0	0,57	0,22	0,75	1,05
7,0	0,52	0,26	0,81	1,04
8,0	0,29	0,18	0,81	0,52

Tableau 2.3. Influence de la concentration en acide lactique dans le milieu sur le taux de croissance, les rendements et la productivité de *Lactobacillus plantarum* (Giraud *et al.*, 1991)

Lactate (g/l)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	Y _{p/s} (g/g)	Productivité (g/l.h)
0	0,57	0,22	0,75	1,05
12	0,55	0,22	0,73	1,01
24	0,49	0,24	0,75	0,8
33	0,41	0,22	0,74	0,58
48	0,37	0,19	0,61	0,45
90	0,06	0,08	0,65	0,09

3. L'ACIDE LACTIQUE

L'acide 2-hydroxypropanoïque ou acide lactique est l'élément principal de tous les produits laitiers acidifiés auxquels il donne leurs caractéristiques fondamentales. C'est un produit naturel non toxique. Il fut identifié en 1847 par Blondeau comme produit de la fermentation bactérienne et mis en évidence pour la première fois dans le lait par Scheele en 1870. C'est en 1881 que sa production industrielle commence aux USA. En 1894, la production, essentiellement destinée aux industries du cuir et du textile atteint 5 tonnes/an (Vick Roy, 1985). Chaque année, environ 50 000 à 80 000 tonnes d'acide lactique sont produites à travers le monde dont 90% sont réalisées à partir de fermentation microbienne. Les 10% restants sont produits synthétiquement à partir du lactonitrile (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000). Le prix d'un kg d'acide lactique peut aller de 1,40 US\$ pour 50% de pureté à 1,90 US\$ pour 88% de pureté (Akerberg et Zacchi, 2000).

C'est le secteur alimentaire qui est le plus gros consommateur de lactate (**Tableau 3.1**). Ce dernier est employé comme conservateur pour les saumures, les produits laitiers, les viandes et le pain, mais aussi comme acidulant pour les bières, les vins et les sucreries (Garde *et al.*, 2002).

Le lactate de calcium est un bon stabilisant et épaississant. Le lactate ferreux est utilisé comme source de fer pour la supplémentation des laits maternisés. Enfin le lactate de potassium et d'ammonium sont connus pour être de très bons humectants, exhausteurs de goût et émulsifiants (Litchfield, 1996).

Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé sous sa forme ester optiquement active pour la synthèse de molécule chirale. Le lactate de sodium est utilisé comme solution de dialyse rénale et le lactate de calcium et celui de magnésium pour le traitement des déficiences en ces minéraux (Narayanan *et al.*, 2004).

Au niveau cosmétique, l'acide lactique est utilisé dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux (Smith *et al.*, 1977), dans les dentifrices comme agent détartrant et dans les lotions contre l'acné (Narayanan *et al.*, 2004).

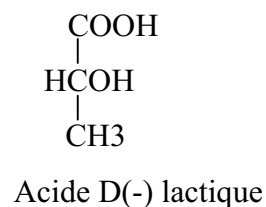
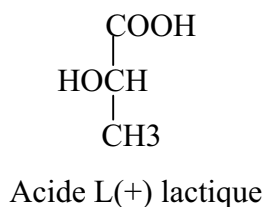
Les nouvelles applications de l'acide lactique sont essentiellement dues à sa forme polymérisée: PLA (Poly Lactic Acid) qui sont biocompatibles, biodégradables et bioassimilables (Bogaert, 1997; Lunt, 1998). Les applications sont multiples et concernent le secteur de la médecine (fils résorbables, implants biodégradables) (Lipinski et Sinclair, 1986); de l'alimentaire (O'marro, 1993); de l'agriculture (système de relargage pour engrais et pesticides) (Lipinski et Sinclair, 1986).

Tableau 3.1. Les applications les plus courantes de l'acide lactique et de ses sels (Wee *et al.*, 2006a)

	Industrie alimentaire -acidulant -agent antimicrobien -exhausteur de goût -contrôleur de pH -fortification minérale	Acide lactique CH₃CHOHCOOH	
	Industrie cosmétique -hydratant -agent d'éclaircissement de peau -agent de rajeunissement de peau - c ontrôleur de pH -agent anti-acné -agent anti-tartre	Industrie chimique -agent de détartrage -contrôleur de pH -neutralisant -intermédiaire chiral -agent complexant -agent de nettoyage -agent de verdissement	Matière chimique -oxyde de propylène -acétaldéhyde -acide propanoïque -2,3-pentanedione -lactate d'ethyl -dilactide -poly(lactic acid)
	Industrie pharmaceutique -solution de dialyse -préparation minérale -encapsulation (comprimés) -implants biodégradables -fils résorbables -contrôle de la libération de médicament		

3.1. Propriétés physicochimiques de l'acide lactique

Les deux isomères optiquement actifs de l'acide lactique sont les formes L(+) et le D(-) (Narayanan *et al.*, 2004).



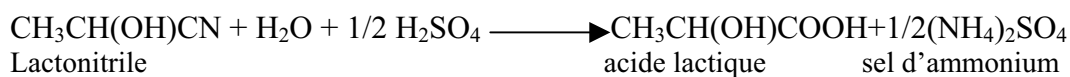
L'acide lactique est soluble dans l'eau, incolore et très peu volatil. En solution à 20% ou plus, il peut se produire une auto-estérification due à la présence des groupements hydroxyle et carboxyle dans la molécule d'acide lactique. Le lactate forme un dimère cyclique appelé lactide ou des polymères linéaires de forme générale $\text{H}[\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CO}]_n\text{OH}$.

Dans l'appréciation du rôle physiologique et de la physiologie de la nutrition de l'acide lactique dans l'organisme il est nécessaire de distinguer entre les formes L(+) et D(-) de cet acide. Il est couramment admis que la forme L(+) est plus rapidement métabolisée que la forme D(-) (Alma, 1982). Aussi il est souvent attribué à l'acide L(+) des qualités nutritionnelles supérieures.

3.2. Production d'acide lactique

3.2.1. La voie chimique

La méthode principale de préparation synthétique est basée sur l'hydrolyse du lactonitrile par l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique (Narayanan *et al.*, 2004):



Le lactonitrile est obtenu par la réaction entre l'acétaldéhyde et l'acide cyanhydrique.

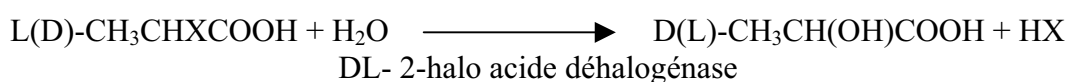
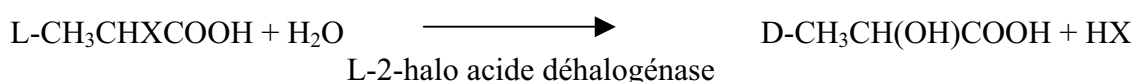


La production d'acide lactique par voie chimique présente l'intérêt d'utiliser des co-produits de l'industrie chimique, mais surtout de produire de l'acide lactique thermostable d'une haute pureté et incolore.

3.2.2. La voie enzymatique

Deux types d'enzyme sont obtenues par fermentation de *Pseudomonas*: la L et la DL2-halo acide déhalogénase (Motosugi *et al.*, 1982a et 1982b). Elles catalysent la déhalogénéation de l'acide 2-halo-propionique comme l'acide 2-chloropropionique, avec inversion de la configuration C₂. (Motosugi *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1995 ; Nardi-Dei *et al.*, 1997).

Les réactions catalysées par ces enzymes sont les suivantes:



La L-2- halo acide déhalogénase agit sur l'isomère L de l'acide chloropropionique. Alors que la DL-2-halo acide déhalogénase catalyse la déhalogénéation des deux énantiomères de l'acide chloropropionique.

3.2.3. La voie fermentaire

Ces dernières années montrent un tournant décisif dans la production d'acide lactique au niveau mondial. L'acide lactique est presque exclusivement produit par fermentation. Les micro-organismes généralement utilisés pour sa production sont variées, mais ce sont les lactobacilles qui sont les plus fréquemment utilisés. Ils peuvent croître à température élevée (40°C) et à faible pH (5 à 7) ce qui limite alors les contaminations. La mise en œuvre de ces micro-organismes en fermenteur est souvent en mode discontinu ou continu. Le **Tableau 3.4** résume les principaux modes de production et les performances obtenues.

3.2.3.1. Micro-organismes producteurs d'acide lactique

Un nombre très important de genres et d'espèces bactériennes et même quelques moisissures transforment des carbohydrates en acide lactique.

- Les bactéries lactiques

Depuis la fin du dernier siècle, les progrès se sont considérablement accélérés, aussi bien dans la connaissance des micro-organismes responsables de la fermentation lactique que pour la mise au point de méthodes de sélection des souches sur des critères d'activité et de résistance. La place importante des bactéries lactiques réside dans leur capacité à fermenter rapidement les sucres en acide lactique. Les bactéries lactiques

homofermentaires comprenant des espèces de streptocoques, entérocoques, lactocoques et lactobacilles convertissent presque quantitativement le glucose en acide lactique (90 à 95%). Le rôle principal des bactéries lactiques est la production par fermentation d'acide lactique et d'autres composés organiques à partir des sucres, produits qui influencent la texture, le goût et la qualité microbiologique des aliments (Singh *et al.*, 2006; De Vos et Hugenholtz, 2004; Caplice et Fitzgerald, 1999). Les lactobacilles sont les micro-organismes les plus fréquemment utilisés pour la production d'acide lactique (**Tableau 3.2**). Les propriétés technologiques apportées par ces bactéries sont nombreuses et variées, parmi elles, l'activité acidifiante est un critère de sélection de première importance, mais à cause de leur faible aptitude à la biosynthèse, elles sont considérées comme un des groupes les plus exigeants au point de vue nutritionnel.

Le groupe des bacilles thermophiles est très hétérogène. Peu de souches sont capables de produire de l'acide lactique en forte concentration. Mais leur caractère thermophile (elles ne se multiplient qu'à partir de 45°C et sont capables de se multiplier à 65°C) constitue un critère de sélection important au niveau industriel (peu de risque de contaminations). C'est le cas de *Bacillus coagulans* hétérofermentaire facultative et aérotolérante (Heriban *et al.*, 1993; Payot, 1999). *Enterococcus faecalis* caractérisé par son aptitude à cultiver dans des conditions hostiles de croissance, thermorésistant, tolérant de larges variations de pH, constitue une souche attractive pour une utilisation industrielle (Wee *et al.*, 2006b).

D'autres utilisent les mutations génétiques pour augmenter la production d'acide lactique, c'est le cas de *Lactobacillus delbruekii* qui produit jusqu'à 117 g/l d'acide lactique contre 67 g/l pour la souche sauvage (Demirci et Pometto, 1992). L'expression des gènes D-LDH et L-LDH correspondant à la production d'acide D(-) et L-lactique a été étudiée chez *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Afin de développer une souche produisant de l'acide L-lactique pur, deux souches *ldhD*-négatives à partir de *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 ont été construites par remplacement de gènes. Une des souches a été construite en supprimant la région promotrice du gène D-LDH, et l'autre a été construite en remplaçant le gène structural de D-LDH avec une copie additionnelle du gène structural (L-LDH) de la même espèce. Les deux souches négatives de D-LDH ont produit seulement l'acide L-lactique avec une quantité égale au lactate produit par le type sauvage.

- Les champignons

Un nombre limité d'autres micro-organismes est capable de produire de l'acide lactique. Parmi ces derniers, il existe quelques moisissures (**Tableau 3.2**). L'utilisation de champignons, tel que *Rhizopus oryzae*, pour la production d'acide lactique présente un intérêt, car elle ne requiert pas de sources d'azotes organiques, utilise des glucides tel que les hexoses ou les pentoses et est facilement séparable du milieu de culture lors des procédés de purification de l'acide lactique (Miura *et al.*, 2003; Magnuson et Lasure, 2004). Ces micro-organismes occupent une place importante sur le marché des enzymes. Il s'agit presque exclusivement d'hydrolases dont les producteurs principaux appartiennent aux zygomycètes. Le genre *Rhizopus* comme *R. oryzae* et *R. arrhizus* possèdent des enzymes amylolytiques capables de transformer l'amidon en acide L(+) lactique (Yin *et al.*, 1997; Oda *et al.*, 2002).

- Les cultures mixtes

Il est assez rare que l'on utilise pour la fabrication des produits laitiers une seule souche de bactérie lactique. En règle générale, on associe plusieurs souches, voir plusieurs espèces et genre bactériens. L'association qui a été la plus étudiée est celle du yaourt, constituée de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Juillard *et al.*, 1987; Zouari et Desmazeaud, 1991; Beal et Corrieu, 1994). Dans un mélange de deux souches, c'est celle dont le taux de croissance est le plus rapide qui devient dominante (Juillard *et al.*, 1987).

Au cours d'une fermentation lactique, deux phénomènes importants interviennent simultanément: l'abaissement du pH, et l'éventuelle élimination de composés inhibiteurs. Avec les cultures mixtes l'abaissement du pH est généralement plus rapide et plus prononcé, ce qui s'explique par la stimulation d'au moins une des souches de mélange.

Le rôle prépondérant joué par les cultures mixtes dans la production d'acide lactique a justifié que leur soit consacrée une attention particulière. Cependant ce système n'est pas encore utilisé à l'échelle industrielle à cause des difficultés rencontrées au cours de l'optimisation des conditions de cultures pour chaque souche, tels que le pH, la température, la demande en oxygène et la composition du milieu de culture. Plusieurs travaux ont été entrepris dans ce sens. Roukas et Kotzekidou (1998) ont travaillé sur la production d'acide lactique à partir de lactosérum en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Ils ont montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture mixte (22,5 g/l),

alors qu'en culture pure de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, les concentrations sont respectivement 16 et 10,5 g/l.

Kurosawa *et al.* (1988) ont utilisé une culture mixte de cellules d' *Aspergillus awamori* et *Streptococcus lactis* immobilisées à l'aide d'alginate de calcium. Dans ce cas l'amidon utilisé comme source de carbone est hydrolysé par des enzymes amylolytiques de *Aspergillus awamori* et le glucose est converti en acide lactique par *Streptococcus lactis*. Le maximum d'acide lactique obtenu est de 25g/l.

Taniguchi *et al.* (2004) ont utilisé une co-culture de deux souches: *Enterococcus casseliflavus* et *Lactobacillus casei* cultivées sur un mélange de glucose et de xylose. Deux étapes d'inoculation ont été réalisées dans lesquelles *Enterococcus casseliflavus* est inoculée après 40 heures de fermentation d'une concentration de *Lactobacillus casei*. Ceci a permis la consommation complète des deux sucres et l'obtention de 95 g/l d'acide lactique après 192 heures de fermentation.

Récemment une co-culture de *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbruekii* cultivée sur de l'hydrolysate d'amidon a permis d'améliorer la production d'acide lactique. Un maximum d'acide lactique de 123 g/l est obtenu après 54 h de fermentation. Dans ce procédé de fermentation lactique, l'amidon est hydrolysé par des enzymes amylolytiques saccharifiantes (Rojan *et al.*, 2006).

Tableau 3.2. Souches sélectionnées pour la production d'acide lactique et leurs performances.

Micro-organisme	Lactate (g/l)	Productivité (g /l.h)	Références
<i>Rhizopus oryzae</i> ATCC 52311	83,0	2,6	Zhou <i>et al.</i> , 1999
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	104,6	1,8	Park <i>et al.</i> , 1998
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	144,0	5,1	Yun <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 10863	67,0	2,5	Berry <i>et al.</i> , 1999
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 15009	65,5	2,7	Schepers <i>et al.</i> , 2002a
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> NRRL B-548	38,7	3,5	Burgos-Rubio <i>et al.</i> , 2000
<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	82,0	5,6	Hujanen et Linko, 1996
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 21028	41,0	1,0	Fu et Mathws, 1999
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041	21,8	0,8	Bustos <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	76,2	0,8	Vishnu <i>et al.</i> , 2000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIMB 8130	90,0	3,8	Kotzanmanidis <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>Lactis</i> IFO 12007	90,0	1,6	Roble <i>et al.</i> , 2003
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG18011	48,7	-	Ohkouchi et Inoue, 2006

3.2.3.2. Milieux de culture

Au niveau industriel l'objectif premier est le développement de procédés performants et innovants en vue de la production d'acide lactique. Bien souvent pour que cela soit économique et rentable, de telles productions peuvent se faire à partir de matières premières brutes non raffinées. De nombreux procédés ont été expérimentés et la matière première y a été diversifiée. Le **Tableau 3.3** donne à titre d'exemple les micro-organismes et les substrats utilisés. Les matières amylacées et cellulosiques présentent un grand intérêt économique. Ils sont abondants et sont moins onéreux (Ohkouchi et Inoue, 2006; Akerberg et Zacchi, 2000; Richter et Berthlod, 1998; Venkatesh, 1997). Plusieurs substrats amylacés ont été utilisés. L'hydrolyse de l'amidon de ces substrats est facilitée par la production à l'échelle industrielle et à bon marché d'enzymes spécifiques telles que les amylases et les amyloglycosidases. Parmi ces substrats nous pouvons signaler le sorgho (Richter et Berthlod, 1998; Richter et Trager, 1994), Le blé (Naveena *et al.*, 2005; Akerbekg et Zacchi, 2000; Akerbeg *et al.*, 1998), le maïs (Oh *et al.*, 2005), la pomme de terre (Xiadong *et al.*, 1997), le manioc (John *et al.*, 2006; Xiadong *et al.*, 1997; Roble *et al.*, 2003), le riz (Oh *et al.*, 2005; Yun *et al.*, 2004), le seigle (Richter et Berthold, 1998), l'orge (Oh *et al.*, 2005; Linko et Javainainem, 1996; Vishnu *et al.*, 2002). Les matières cellulosiques sont également intéressantes pour la production d'acide lactique. Venkatech (1997) ainsi que Yanez *et al.* (2003) ont utilisé un procédé de saccharification et de fermentation simultanées, en utilisant la cellulose pure. Yanez *et al.* (2005); Parck *et al.* (2004) ont utilisé les déchets de papier, Moldes *et al.* (2001); Wee *et al.* (2004a) ont utilisé le bois. Garde *et al.* (2002) ont utilisé l'hydrolysate d'hémicellulose.

Sreenath *et al.* (2001) ont étudié la production d'acide lactique à partir des déchets agricoles comme la luzerne, la farine de son de blé et la poudre de paille.

Les techniques les plus avancées visent à valoriser le lactosérum par biotransformation. Le lactosérum est un aliment intéressant non seulement par la présence du lactose, mais aussi par la teneur en protéines et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B et des sels minéraux. En effet pour une utilisation complète du lactose, il est indispensable de compléter le lactosérum en sources azotées. Amrane et Prigent (1998); Kulozik et Wilde (1999); Shepers *et al.* (2002) ont utilisé l'extrait de levure comme source azotée pour la production d'acide lactique. L'extrait de levure est la source d'azote la plus efficace, mais ce substrat est très onéreux. Et par souci de minimisation du coût de production d'acide lactique, on a assisté ces dernières années à la mise au point de procédés d'enrichissement protéique de matières premières.

Différentes sources azotées sont utilisées en complément du substrat de fermentation: l'hydrolysate de protéines de lactosérum (Fitzpatrick et Keeffe, 2001), l'extrait de germe de malt (Pauli et Fitzpatrick, 2002), l'hydrolysate de cornes de bélier (Kurbanoglu et Kurbanoglu, 2003), la liqueur de « corn steep » ou extrait soluble de maïs (Wee *et al.*, 2006b), l'extrait de soja (Ohara et Yahata, 1996) et les sels d'ammonium (Hujanen et Linko, 1996).

Tableau 3.3. Matières premières de faible coût utilisées pour la production d'acide lactique

Matières premières	Micro-organismes	Références
Hemicellulose	<i>Bacillus</i> sp. 17C5	Patel <i>et al.</i> , 2004
Mélasses	<i>Lactobacillus delbrukei</i> NCIMB 8130	Kotzanmanidis <i>et al.</i> , 2002
	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Wee <i>et al.</i> , 2004b
Seigle	<i>Lactobacillus paracasei</i> N°8	Richter et Berthold, 1998
Sorgho	<i>Lactobacillus paracasei</i> N°8	Richter et Berthold, 1998
Blé	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Oh <i>et al.</i> , 2005
Maïs	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Oh <i>et al.</i> , 2005
Manioc	<i>Lactobacillus casei</i> NCIMB 3254	Rojan <i>et al.</i> , 2005
Pomme de terre	<i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620	Yun <i>et al.</i> , 2004
Riz	<i>Lactobacillus</i> sp. RKY2	Yun <i>et al.</i> , 2004
Orge	<i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	Vishnu <i>et al.</i> , 2002
Cellulose	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp <i>torquens</i> 25600	Yanez <i>et al.</i> , 2003
Corn cob	<i>Rhizopus</i> sp. MK-96-1196	Miura <i>et al.</i> , 2004
Déchet de papier	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp <i>torquens</i> 25600	Yanez <i>et al.</i> , 2005
	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	Parck <i>et al.</i> , 2004
Bois	<i>Lactobacillus delbrukei</i> NRRL B-445	Moldes <i>et al.</i> , 2001
	<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	Wee <i>et al.</i> , 2004a
Lactosérum	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	Büyükkilci et Harsa, 2004
	<i>Lactobacillus helveticus</i> R211	Schepers <i>et al.</i> , 2002

3.2.3.3. Procédés de fermentation

3.2.3.3.1. Réacteurs discontinus

Pour de nombreuses productions, les procédés mis en œuvre sont surtout de type batch. Ce mode de fermentation est très développé au niveau industriel. Ce dernier permet d'étudier les conditions de culture des souches d'une part, et d'autre part développer les performances de la fermentation lactique en testant différents substrats raffinés ou non. Les micro-organismes possèdent des capacités extrêmement variées d'adaptabilité à la température et au pH. Dans un milieu contenant tous les nutriments requis et dans un environnement physicochimique favorable, la souche montre une aptitude à la croissance et à la production plus importante. Payot *et al.*, (1999) ont montré que la production d'acide lactique par *Bacillus coagulans* dépend de la température, du pH mais aussi de la source d'azote. Pour une concentration de saccharose de 60 g/l, un pH de 6,4 et une température de 52°C, les concentrations de biomasse et d'acide lactique sont respectivement 3,5 et 55 g/l. Le pH influence la vitesse de catalyse des enzymes et donc la vitesse de croissance et de production (Yoo *et al.*, 1996; Kumar-Dutta *et al.*, 1996; Amrane et Prigent, 1999; Guyot *et al.*, 2000). Lors de cultures à pH libre, la diminution du pH se combine à l'accumulation de l'acide lactique et conduit à une forte inhibition de la croissance et du métabolisme bactérien dû à la forme non dissociée du lactate qui influence les rendements de conversion du substrat en biomasse et en produit (Gätje et Gottshalk, 1991; Norton *et al.*, 1993; Goncalves *et al.*, 1991). L'avantage du mode discontinu est principalement lié aux rendements obtenus en présence d'une source d'azote importante. Plusieurs études sur l'effet des sources azotées ont été réalisées et ont permis d'améliorer les performances de production d'acide lactique (Hujanen et Linko, 1996; Arasaratnam *et al.*, 1996; Morabito, 1994; Oh *et al.*, 2005). Le **Tableau 3.4** résume les principaux modes de production et les performances obtenues.

Tableau 3.4. Performances des fermentations lactiques selon le mode de culture

Mode de culture	Micro-organisme	Source carbonée	Lactate (g/l)	Productivité (g/l.h)	Références
Discontinu	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Glucose	125	2,2	Kwon <i>et al.</i> , 2000
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Lactose	95,7	4,0	Oh <i>et al.</i> , 2003
	<i>Bacillus coagulans</i>	Saccharose	57	1,2	Payot, 1998
	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	103	2,2	Büyükkilleci et Harsa, 2004
Dicontinu à cellules immobilisées	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	125,6	3,45	Göksungur <i>et al.</i> , 2005
Semi-continu	<i>Lactobacillus casei</i> et <i>Lactococcus lactis</i> (co-immobilisées)	Lactose	47	2	Roukas et Kotzekidou, 1998
Continu	<i>Lactobacillus lactis</i>	glucose	210	2,2	Bai <i>et al.</i> , 2003
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	glucose	45	15,74	Liew <i>et al.</i> , 2006
	<i>Lactobacillus delbrukei</i>	Glucose	25	9	Major et Bull, 1985
Continu bi-étagé	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	38	5,7	Amrane et Prigent, 1996
Continu à cellules immobilisées	<i>Lactobacillus</i> spp.	Lactose	33	6	Zayed et winter, 1995
	<i>Lactobacillus casei</i>	Glucose	27	1,6	Guoqiang <i>et al.</i> , 1991
	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	Glucose	22,4	9	Cotton <i>et al.</i> , 2001
Continu avec recyclage cellulaire	<i>Lactococcus lactis</i>	Glucose	30,1	33,1	Nolasco-Hipolito et al., 2002
	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	Glucose	52	12	Yoo <i>et al.</i> , 1997
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Glucose	92	57	Know <i>et al.</i> , 2001

3.2.3.3.2. Réacteurs semi continus

Les cultures semi continues sont réalisées afin d'améliorer les performances du procédé de fermentation lactique. En effet ce mode de culture permet généralement d'obtenir des concentrations cellulaires élevées et, dans la mesure où il est possible d'agir sur une ou des concentrations en substrat dans le milieu de culture, d'améliorer la productivité volumétrique du produit. Peu de travaux ont été réalisés en ce qui concerne la production d'acide lactique dans ces conditions. Notons que Roukas et Kotzekidou (1998) ont utilisé une culture mixte de cellules libres et co-immobilisées de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Dans les deux cas le procédé semi continu a permis d'améliorer les performances de fermentation. Pour le semi continu utilisant les cellules libres, la productivité volumétrique et la concentration finale d'acide lactique ont doublé (1,91 g/l.h, 46 g/l) par rapport au discontinu (0,93 g/l.h, 22,5 g/l). Bai *et al.* (2003) ont réalisée une hyperproduction d'acide lactique en utilisant *Lactobacillus lactis*. Un maximum d'acide lactique de 210 g/l est obtenu avec une productivité de 2,2 g/l.h.

3.2.3.3.3. Réacteurs continus

La productivité des fermentations en mode discontinu n'est pas optimale d'un point de vu économique. En conséquence, de nombreuses recherches se sont concentrées sur le mode continu pour améliorer ce paramètre économique (Litchfield, 1996; Hofvendahl *et al.*, 2000). En effet la possibilité de faire varier et de contrôler la vitesse spécifique de croissance en changeant le régime d'addition du substrat limitant est un des avantages majeurs par rapport aux cultures discontinues. Ganzalez *et al.* (1996) ont montré que le taux de dilution n'influence pas les fractions de L(+) lactate et D(-) lactate produits par *Lactobacillus casei* subsp. *casei* et *Lactobacillus coriniformis* subsp. *torquens* respectivement. Liew *et al.* (2006) ont obtenu une concentration et une productivité maximum en acide lactique de 45 g/l et 15,74 g/l.h respectivement en utilisant *Lactobacillus rhamnosus*, ceci avec un taux de dilution de 0,35 h⁻¹. Il existe aussi des systèmes de culture continue à deux ou plusieurs réacteurs, ce qui permet une plus grande flexibilité pour l'optimisation. Le système multi-étagé permet de séparer la croissance cellulaire de la production (Mulligan et Safi., 1991; Amrane et Prigent, 1996). Le principe de ce système consiste à faire la croissance dans le premier réacteur, puis faire la production dans les autres réacteurs en alimentant par les cellules provenant du premier réacteur. Les productivités observées varient alors entre de 2 et 6 g/l.h.

- Réacteur continu avec recyclage cellulaire

Une autre technique fait appel à des systèmes à haute densité cellulaire. Ces conditions de haute densité cellulaire sont obtenues grâce à la séparation de la biomasse cellulaire (et par là même également des métabolites) du milieu de fermentation. Les méthodes utilisées font intervenir la filtration sur membrane avec recyclage de la biomasse (Litchfield, 1996). Ces bioréacteurs à membranes sont très performants. Ils permettent en effet d'augmenter la productivité. Mais ils ont tout de même un inconvénient majeur: la fragilité des membranes et le problème lié aux colmatages (Roychoudhury *et al.*, 1995).

Kim *et al.* (2006) ont utilisé *Lactobacillus* sp. dans un procédé batch en série avec recyclage cellulaire, et ont obtenu une productivité maximale de 6,4 g/l.h. Oh *et al.* (2003) ont obtenu une productivité de 6,2 g/l.h en utilisant *Enterococcus faecalis*, Wee *et al.* (2006b), quant à eux, ont atteint une productivité de 4 g/l.h avec la même souche. Know *et al.* (2001) ont obtenu une productivité de 57 g/l.h avec *Lactobacillus rhamnosus* (culture continue biétagé à recyclage). You *et al.* (1997) obtiennent 12 g/l.h avec *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.

- Réacteur continu avec cellules immobilisées

L'immobilisation ou plus exactement la rétention en phase insoluble de cellules, possède des avantages potentiels. Le premier d'entre eux est l'obtention de hautes densités cellulaires. Bergmaier *et al.* (2003) ont rapporté de fortes concentrations de cellules de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M immobilisées dans un support de caoutchouc de silicone poreux ($8.5 \cdot 10^{11}$ UFC/ml de support) pour la production d'exopolysaccharide.

Les utilisations potentielles des bactéries lactiques immobilisées se sont multipliées. De nombreuses investigations ont été menées sur cette technique avec l'utilisation de différents supports. Les plus utilisés sont: l'alginate de calcium (Goksunger et guvenç, 1999; Guoqiang *et al.*, 1991; Roukas et kotzekidou, 1996) et l'alginate de sodium (Yan *et al.*, 2001; Klinkerberg *et al.*, 2001). Senthuran *et al.* (1999) ont étudié l'encapsulation des cellules de *Lactobacillus casei* par polymérisation du polyéthylèneimine. Ce système est couplé à un recyclage cellulaire. L'avantage principal de ce procédé découle de la relativement faible taille des capsules et dans la faible épaisseur des membranes qui permettent de favoriser les transferts de matière. Cotton *et al.* (2001) ont testé un système avec biofilm. Ils utilisent des supports en plastic composés

principalement de polypropylène. Vick Roy *et al.* (1982) ont utilisé un bioréacteur à fibres creuses pour immobiliser *Lactobacillus delbrukei*, Roukas et Kotzekidou, (1991) ont co-immobilisé *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* dans du polyacrylamide. Buyukgungor (1992) a immobilisé *Lactobacillus bulgaricus* dans du carraghénane. Tuli *et al.* (1985) ont utilisé des billes d'agar. Krischke *et al.* (1991) ont utilisé des billes de verre pour immobiliser *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.

Cependant, certains problèmes se posent dans l'utilisation de cellules immobilisées, un des facteurs limitants essentiels étant la limitation diffusionnelle des substrats vers les cellules. Donc le choix du procédé est dicté par le type de cellules, le type de produits formés, et la stabilité du système et bien évidemment des considérations économiques.

4. MODELISATION

La modélisation mathématique des procédés de fermentation consiste à rendre compte sous forme d'équations, dont certaines sont des équations différentielles, de l'évolution des variables importantes ou fondamentales des procédés. Les variables prises en compte sont d'abord et le plus généralement les concentrations en biomasses, en substrat et en métabolites. Un modèle doit représenter une réalité simplifiée et son objectif est d'être utilisé pour élargir les connaissances du système. Généralement, la modélisation se fait avec des résultats obtenus sur milieux synthétiques avec lesquels des bilans matières peuvent être faits. Sur milieux complexes, la modélisation est plus compliquée car les substrats ne sont pas tous identifiés.

La modélisation est utilisée pour l'interprétation des résultats expérimentaux, l'optimisation, l'extrapolation et l'automatisation.

On distingue essentiellement deux types de modèles:

- Les modèles non structurés: se sont des modèles descriptifs qui utilisent les cinétiques microbiennes afin de décrire les évolutions des vitesses de croissance, de l'utilisation des substrats et de production de métabolites. Ils sont généralement plus simples et ont été les premiers modèles utilisés.
- Les modèles structurés ou physiologiques tiennent compte de l'évolution interne du microorganisme. Ils décrivent les voies métaboliques empruntées et prennent en compte des caractéristiques intracellulaires.

4.1. Modélisation de la fermentation lactique

Dans le cas de la fermentation lactique la modélisation de la croissance bactérienne et de l'évolution des métabolites repose en général sur les phénomènes des inhibitions exercées par le substrat et le produit l'acide lactique. Les effets des autres paramètres déterminants des conditions de culture sont bien souvent non pris en compte. En effet certains d'entre eux, dont par exemple le pH et la température, sont souvent fixés à une valeur donnée et régulés. Les autres ne sont pas, dans les conditions générales d'étude, à considérer (agitation, oxygène dissous, etc).

La fermentation lactique a été l'objet de nombreuses études de modélisations et cela a conduit à des modèles cinétiques qui ont été très utilisés. Le modèle le plus utilisé est celui décrit par Monod (1942). Cette expression a été largement appliquée pour décrire les procédés de fermentation. D'autres termes supplémentaires ont été ou peuvent être

ajoutés à l'équation de base, ceci afin de tenir compte de phénomènes d'inhibition par le produit et/ou le substrat.

Différentes approches ont été faites pour dégager un modèle de comportement de la cellule biologique et de ses mutations physiologiques en fonction du milieu de culture. Les modèles physiologiques les plus simples ne considèrent que l'attitude globale du micro-organisme vis-à-vis du substrat. L'un d'eux est le modèle de Nielsen *et al.* (1991a et 1991b) divisant la cellule en deux compartiments, le premier actif vis-à-vis du substrat, responsable de la synthèse d'éléments cellulaires, le second, inactif vis-à-vis du substrat, contient l'information génétique nécessaire au premier.

Nikolajsen *et al.* (1990) ont repris le modèle de Nielsen (1991b) et proposent un modèle qui tient compte des phénomènes de répression catabolique. Ce modèle est capable de simuler un discontinu triauxique.

Gadgil et Venkatesh (1997) proposent un modèle qui tient compte des effets du pH et des ions lactate sur l'activité de la β -galactosidase. Les vitesses de croissance et de production dépendent de la quantité d'enzyme synthétisée. Le modèle développé simule l'effet du pH et de la concentration d'acide lactique sur l'expression et la dégradation de l'enzyme.

Hoefnagel *et al.* (2002) proposent un modèle qui simule la fermentation homolactique à 97%. Ces auteurs utilisent la méthode d'analyse et de contrôle métabolique (MCA) pour identifier les enzymes clés responsables du contrôle du flux métabolique. Le modèle permet de simuler la distribution du flux carboné à partir du pyruvate.

Bajpai-Dikshit *et al.* (2003) proposent un modèle structuré rendant compte de la production d'acide lactique sur un milieu contenant différents substrats. L'optimisation de ce modèle permet de prédire les cinétiques sur milieu contenant un mélange de glucose/lactate, citrate/lactate et glucose/pyruvate. Un phénomène d'utilisation séquentielle et simultanée du glucose et des acides organiques est décrit.

Les modèles cinétiques sont les plus répandus et les plus utilisés pour décrire la fermentation lactique. C'est pourquoi nous nous intéressons dans ce chapitre à la description de ces modèles non structurés.

Le modèle le plus utilisé pour décrire la croissance est celui de Monod (1942), reliant la vitesse de spécifique de croissance du micro-organisme à la consommation du substrat:

$$\mu = \mu_{\max} \left[\frac{S}{K_s + S} \right]$$

μ est le taux de croissance (h^{-1})

$\mu_{\max}$ est le taux de croissance maximum (h^{-1})

S est la concentration en substrat (g.l^{-1})

K_s est la concentration pour laquelle $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$ (g.l^{-1})

Le modèle de référence pour la production d'acide lactique est décrit par Luedeking et Piret (1959). Ce modèle traduit une production liée et non liée à la croissance.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

α est le coefficient de production associée à la croissance (g.g^{-1})

β est le coefficient de production non associée à la croissance ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

La majorité de modèles proposés pour décrire la fermentation lactique sont du type cinétique de Luedeking et Piret (1959) ou modifiés.

C'est le cas par exemple du modèle de Kumar Dutta *et al.* (1996). Ces auteurs ont développé un modèle mathématique à partir de *Lactobacillus delbrueckii* sur glucose. Ce modèle introduit l'effet de l'inhibition du produit et un terme de maintenance.

Les équations du modèle sont les suivantes:

$$\frac{dX}{dt} = \left[\mu_{\max} (1 - c_P / c_{P*})^n \right] S / (K_S + S)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left[\alpha \mu_{\max} (1 - c_P / c_{P*})^n S / (K_S + S) + \beta \right] X$$

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} - mX$$

c_{P*} : concentration maximale d'inhibition par l'acide lactique (g.l^{-1})

n : est une puissance d'inhibition

m : constante de maintenance (h^{-1})

Monteagudo *et al.* (1997) ont développé un modèle mathématique sur mélasses à partir de *Lactobacillus delbrueckii*. Ce modèle est exprimé par trois équations représentant la croissance, la production d'acide lactique et la consommation du substrat.

La croissance tient compte de la concentration en acide lactique:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left[S / (K_S + S) \right] \left[(1 - P / P_{\max}) \right] X$$

Le modèle de Luedeking-Piret a été modifié en rajoutant un terme d'inhibition de la production par l'acide lactique:

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha dX / dt + \beta X) (1 - P / P'_{\max})$$

$$\frac{dS}{dt} = -1 / Y_{X/S} dX / dt - 1 / Y_{P/S} dP / dt - mX$$

$P_{\max}$: concentration maximale au-delà de laquelle la bactérie ne croît plus (g.l⁻¹)

$P'_{\max}$: concentration maximale au-delà de laquelle la production s'arrête (g.l⁻¹)

α : coefficient d'énergie pour la croissance (g.g⁻¹)

β : coefficient d'énergie pour la maintenance (g.g⁻¹.h⁻¹)

Amrane et Prigent (1999b) ont modélisé la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus* sur du lactosérum. La production et la croissance sont partiellement associées. Ce phénomène est lié à la source azotée: en milieu riche en extrait de levure la production est associée à la croissance et dans le cas contraire la croissance et la production sont dissociées. Un terme correctif $[1 - e^{-F \cdot \mu}]$ est introduit au modèle de Luedeking et Piret. Ce dernier tient compte de l'arrêt de la production à la fin du batch du à une limitation du substrat et l'autolyse des cellules:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X [1 - e^{-F \cdot \mu}]$$

F est une constante qui caractérise la consommation de la source azotée (h)

Le modèle de Yabannavar et Wang (1991) a été modifié par Berry *et al.* (1999). Ce modèle décrit la croissance, la consommation du substrat et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu synthétique. Les premières modifications apportées sont l'introduction d'un terme de décès et la relation de la production d'acide lactique non associée à la croissance:

$$r_X''' = dX / dt = \mu X - K_d X$$

$$\mu = [(\mu_{\max} S) / (K_S + S)] [1 - L / K_{\mu L}] \exp(-LH / K_{\mu LH})$$

K_d : constante de décès (h⁻¹)

$K_{\mu L}$: constante d'inhibition par l'acide lactique dissocié (mol.l⁻¹)

$K_{\mu LH}$: constante d'inhibition par l'acide lactique non dissocié (mol.l⁻¹)

En considérant que la formation d'acide lactique est la combinaison du mécanisme de croissance associée et non associée et que la production non associée à la croissance est également dépendante du substrat, la cinétique de formation du produit peut être décrite par l'équation suivante:

$$dP/dt = \alpha\mu X + \beta XS / (K_S + S)$$

A partir de là, la relation entre la consommation du glucose et la production d'acide lactique peut être décrite par l'équation suivante:

$$dS/dt = -\frac{1}{Y_{P/S}} dP/dt$$

Ben Youssef *et al.* (2000) ont identifié trois mécanismes influençant la croissance:

- une inhibition linéaire du à l'acide lactique avec une concentration tolérée P_C^{gc} évaluée à 95 g /l.
- l'inhibition hyperbolique de la croissance due à la combinaison de la limitation nutritionnelle et l'accumulation du produit.
- L'effet de la limitation nutritionnelle du à une diminution du substrat carboné.

D'après ces trois mécanismes, le modèle peut être décrit ainsi:

$$\mu = \bar{\mu}_{\max} \left(\frac{\bar{K}_P^{gc}}{\bar{K}_P^{gc} + P} \right) \left(\frac{S}{K_S^{gc} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_C^{gc}} \right)$$

Il y a une proportionnalité entre la production et la consommation, donc le rendement est constant. Une faible quantité de glucose est convertie en biomasse:

$$q_S = \frac{V_P}{Y_{P/S}}$$

Il a été observé que la croissance est partiellement associée à la production et le découplage de la production s'arrête après épuisement du substrat:

$$v_P = \delta\mu + \beta \left(\frac{S}{\bar{K}_S^{rc} + S} \right)$$

Le modèle quantifie la limitation nutritionnelle et dépend d'un facteur d'enrichissement α :

$$\bar{\mu}_{\max} = \mu_{\max} \frac{(\alpha - \alpha_0)}{K_{\alpha\mu} + (\alpha - \alpha_0)}$$

$$\overline{K}_P^{gc} = K_{P_{\max}}^{gc} \frac{(\alpha - \alpha_0)}{K_{\alpha P} + (\alpha - \alpha_0)}$$

$$\overline{K}_S^{rc} = K_{S_{\max}}^{rc} \frac{(\alpha - \alpha_0)}{K_{\alpha S} + (\alpha - \alpha_0)}$$

$\overline{K}_P^{gc}$: constante d'inhibition par l'acide lactique (g.l⁻¹)

P_C^{gc} : concentration critique d'acide lactique (g.l⁻¹)

δ : constante d'association de la croissance et la production (g.g⁻¹)

$K_{\alpha\mu}$, $K_{\alpha P}$ et $K_{\alpha S}$ sont des constantes de saturation

$\overline{K}_S^{rc}$: affinité des cellules en maintenance pour le glucose (g.l⁻¹)

α : facteur d'enrichissement

α_0 : facteur minimal nutritionnel nécessaire pour la croissance

β : constante de dissociation de la production et de la croissance (g.g⁻¹.h⁻¹)

gc : growth cell

rc : residual cell

Boonmee *et al.* (2003) ont développé un modèle basé sur celui de Luedeking-Piret. Ce modèle a été par la suite développé en introduisant un terme de limitation par le substrat (lactose), un terme d'inhibition par le produit (acide lactique) et un terme d'inhibition par des concentrations élevées en substrat (lactose). Le modèle est représenté par les équations suivantes:

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

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + q_{P_{\max}} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) \left(1 - \frac{P - P_{ip}}{P_{mp} - P_{ip}} \right) \left(\frac{K_{ip}}{K_{ip} + S} \right) X$$

$$\frac{dS}{dt} = q_{S_{\max}} \left(\frac{S}{K_{ss} + S} \right) \left(1 - \frac{P - P_{is}}{P_{ms} - P_{is}} \right) \left(\frac{K_{is}}{K_{is} + S} \right)$$

P_m : concentration maximale d'acide lactique (g.l⁻¹)

P_i : seuil de concentration d'acide lactique (g.l⁻¹)

K_{ip} : constante d'inhibition par l'acide lactique (g.l⁻¹)

K_{is} : constante d'inhibition par le substrat (g.l⁻¹)

K : constante de limitation du substrat (g.l⁻¹)

Biazar *et al.* (2003) ont développé un modèle cinétique sur lactosérum à partir de *Lactobacillus helveticus*. Ce modèle tient compte de l'effet de limitation de substrat, de l'inhibition par le substrat, de l'inhibition par l'acide lactique, de la maintenance, d'un terme de décès, de l'utilisation du substrat et de la production d'acide lactique.

La croissance cellulaire peut être décrite comme suit:

$$\frac{dX}{dt} = \left[\mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_{is}}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d \right] X$$

L'utilisation du substrat par *Lactobacillus helveticus* peut être décrite comme suit:

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\frac{X}{Y_{X/S}} \left(\mu_m \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_{is}}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d \right) + mX + \frac{1}{Y_{P/S}} \frac{dP}{dt} \right]$$

La production d'acide lactique est exprimée par la relation suivante:

$$\frac{dP}{dt} = X \left[\left(\mu_m \alpha \frac{S}{K_s + S} e^{-\left(\frac{S}{K_{is}}\right)^{n_1}} e^{-\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}} - K_d \right) + \beta \right]$$

n_1 et n_2 sont des puissances pour la fonction exponentielle

$\left(\frac{S}{K_{is}}\right)^{n_1}$: facteur d'inhibition par le substrat (g.l^{-1})

$\left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^{n_2}$: facteur d'inhibition par le produit (g.l^{-1})

Bâti *et al.* (2004) ont développé un modèle qui prend en considération l'inhibition de la croissance sous des conditions de cultures sub-optimales de température qui sont accompagnés par une augmentation d'énergie de maintenance. La vitesse de croissance doit tenir compte de l'inhibition par l'acide lactique et la variation de l'énergie de maintenance qui est fonction de la température.

$$\mu = 0 \quad \text{si } \Theta > \Theta_m$$

$$\mu = a v_p - m \quad \text{si } \Theta < \Theta_m$$

L'évolution du coefficient de l'énergie de maintenance suit une hyperbole :

$$m = b \frac{\Theta_m - \Theta}{c + (\Theta_m - \Theta)}$$

En tenant compte du substrat résiduel à de faibles températures:

$$m = b \frac{S}{K_a + S}$$

donc:

$$m = b \frac{\Theta_m - \Theta}{c + (\Theta_m - \Theta)} \frac{S}{K_a + S}$$

Si la température est inférieure à la température maximale:

$$\mu = a v_p - b \frac{\Theta_m - \Theta}{c + (\Theta_m - \Theta)} \frac{S}{K_a + S}$$

$$\nu_{P_{\max}} = (K_b \Theta - K_c)^2$$

L'évolution de la vitesse spécifique de production en fonction de la concentration d'acide lactique est décrite en utilisant une fonction de type exponentielle:

$$\nu_P = \nu_{P_{\max}} e^{-K_p P}$$

Les résultats ont montré que la croissance s'arrête avant la consommation complète du glucose:

$$\nu_P = \nu_{P_{\max}} \frac{S}{K_s + S}$$

$$\nu_P = \nu_{P_{\max}} \frac{S}{K_s + S} e^{-K_p P}$$

La production d'acide lactique et la consommation du glucose sont proportionnelles et le rendement $Y_{P/S}$ est pratiquement constant. A une température optimale de croissance (37°C), le glucose permet aussi la formation de la biomasse. Donc $Y_{X/S}$ augmente. L'expression de la vitesse de consommation doit tenir compte de ces deux facteurs:

$$q_S = \frac{\nu_P}{Y_{P/S}} + \frac{a \nu_P}{Y_{X/S}}$$

Θ_m : température maximale de croissance

a : rendement biomasse sur lactate $Y_{X/p}$ (g.g⁻¹)

b : maintenance maximale (g.g⁻¹.h⁻¹)

c : constante d'affinité (°C)

K_s : constante d'affinité anabolique (cellules en croissance) (g.l⁻¹)

K_a : constante d'affinité catabolique (cellules en maintenance) (g.l⁻¹)

K_p : constante d'inhibition (g.l⁻¹)

K_b et K_c sont des constantes

$\nu_{P_{\max}}$: vitesse spécifique maximale de production (g.g⁻¹.h⁻¹)

Amrane (2005 et 2001) ont modifié le modèle développé par Amrane (1999b) en remplaçant le terme correctif $e^{-F \cdot \mu}$ par une expression tenant en compte de la limitation du substrat:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left[1 - \frac{S_{res}}{S} \right]$$

S : la concentration du lactose au temps t

S_{res} : la concentration du lactose à la fin du batch

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left[1 - \frac{S_{res} * Y_{p/s}}{S_0 * Y_{p/s} - (P - P_0)} \right]$$

Neysens et De Vuyst (2005) reprennent le modèle de Messens *et al.* (2003) en tenant compte d'un terme de décès cellulaire.

$$\frac{dX}{dt} = \left[\mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^n - K_d \right] X$$

Lactobacillus amylovorus cultivé sur maltose (M) et fructose (F) consomme les deux sucres simultanément:

$$\frac{dM}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/M}} \frac{dX}{dt} - m_M X$$

$$\frac{dF}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/F}} \frac{dX}{dt} - m_F X$$

La vitesse de production d'acide lactique est fonction de la consommation du maltose et du fructose:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{Y_{p/s}} \left(\frac{dM}{dt} + \frac{dF}{dt} \right)$$

K_d : constante de décès cellulaire (h^{-1})

m_M : coefficient de maintenance pour le maltose ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)

m_F : coefficient de maintenance pour le fructose ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)

Altioik *et al.* (2006) ont étudié la production d'acide lactique sur lactosérum par *Lactobacillus casei*. Le modèle établi tient compte de l'inhibition par l'acide lactique.

L'expression de la croissance est la suivante:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^f \left(1 - \frac{p}{p_m} \right)^h$$

Le modèle modifié de Luedeking et Piret est utilisé pour modéliser la production:

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

La consommation du lactose est liée à la croissance, à la production et à la maintenance.

La consommation est donnée par l'expression suivante:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} - \frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dp}{dt} - m_s X$$

h : puissance d'inhibition par l'acide lactique

f : puissance d'inhibition de la biomasse

P_m : concentration maximale d'inhibition par l'acide lactique (g.l⁻¹)

X_m : concentration maximale de biomasse (g.l⁻¹)

Lan *et al.* (2006) ont repris le modèle de Messen *et al.* (2003). Ce dernier tient compte de l'inhibition de la croissance par l'acide lactique:

$$\mu = K \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^n X$$

K : constante (h⁻¹)

n : puissance d'inhibition par l'acide lactique

X_m : biomasse maximale (g.l⁻¹)

La production d'acide lactique est partiellement associée à la croissance:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

L'acide lactique produit est classé en trois catégories en relation avec α et β :

$\alpha > 0$ et $\beta = 0$: l'acide lactique est associé à la croissance

$\alpha = 0$ $\beta > 0$: l'acide lactique est lié à la maintenance

$\alpha > 0$ $\beta > 0$: l'acide lactique est lié à la croissance et à la maintenance

α : terme indiquant que la production est liée à la croissance (g.g⁻¹)

β : terme indiquant que la production est non liée à la croissance (h⁻¹)

La consommation du substrat est partiellement liée à la croissance

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} - m_s X$$

m_s : coefficient de maintenance

$$Y_{x/s} = - \frac{dX}{dS_{growth}}$$

$$m_s = - \frac{dS_{maint}}{dt} \frac{1}{X} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

Balannec *et al.* (2007) ont repris le modèle de Amrane et Couriol (2002). Ces auteurs ont introduit un terme tenant compte de l'inhibition par l'acide lactique non dissocié. La relation entre le pH et l'acide lactique est décrite par l'équation d'Henderson Hasselbach:

$$[HL] = \frac{L^-}{10^{pH - pKa}}$$

$$P = [HL] + [L^-]$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \left(1 - \frac{[HL]}{[HL]_{inh}} \right)$$

p : acide lactique total (g.l⁻¹)

HL : acide lactique non dissocié (g.l⁻¹)

L^- : acide lactique dissocié (g.l⁻¹)

CHAPITRE II

Matériel et méthodes

**- CHAPITRE II -
Matériel et méthodes**

SOMMAIRE

1. MICROORGANISMES	76
2. MILIEUX DE CULTURE	76
2.1. Milieux de préculture	76
2.2. Milieu de production	77
2.3. Milieux d'alimentation	77
2.4. Lactosérum déprotéiné	78
3. STERILISATION	78
4. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES	78
5. METHODES DE FERMENTATION	80
5.1. Conservation des souches	80
5.2. Propagation de la souche	80
5.3. Cultures	81
5.3.1. Cultures en Erlenmeyer	81
5.3.2. Culture en fermenteur	81
5.3.2.1. Description des fermenteurs	81
5.3.2.2. Protocole des fermentations discontinues	82
5.3.2.3. Protocole des fermentations semi-continues	82
5.3.2.4. Protocole des fermentations continues	82
6. METHODES D'ANALYSE	82
6.1. Estimation de la biomasse	83
6.1.1. Evaluation de la biomasse par densité optique	83
6.1.2. Numération sur milieux gélosés	83
6.2. Dosage du glucose et du lactate par kit enzymatique	83
6.2.1. Dosage du glucose	84
6.2.2. Dosage du lactate	84
6.3. Dosage des sucres et du lactate par CLHP	84
6.4. Dosage des sucres réducteurs	85
6.5. Dosage de l'azote total	85
7. PREPARATION DE L'EXTRAIT CELLULAIRE	85
8. EXPLOITATION DES DONNEES EXPERIMENTALES	86
8.1. Réacteur discontinu	86
8.2. Réacteur semi-continu	88
8.3. Réacteur continu	89

1. MICRO-ORGANISMES

La souche initiale utilisée lors de ce travail est une souche de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* (*Lactobacillus delbrueckii* NRRL-B445) fournie par DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen). C'est une bactérie homofermentaire qui produit essentiellement de l'acide L(+) lactique à partir de différentes sources carbonées. Cette souche est thermophile et résiste à de grandes concentrations en acide lactique d'où son très grand intérêt pour l'industrie. En plus de cette souche, une autre souche mésophile homofermentaire, sélectionnée pour la production d'acide lactique L(+) a été utilisée pour la réalisation de la culture mixte. C'est une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 fournie par l'Institut Pasteur.

2. MILIEUX DE CULTURE

2.1. Milieux de préculture

Le milieu Man Rogosa et Sharpe (MRS) pour le *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* et le milieu M17 pour le *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sont utilisés sous forme liquide. Ces milieux-là ont les compositions suivantes :

Milieu MRS

Polypeptone	10 g/l
Extrait de viande	8 g/l
Extrait de levure	4 g/l
Glucose	20 g/l
Tween 80	1ml/l
Phosphate dipotassique	2 g/l
Acétate de sodium	5 g/l
Citrate d'ammonium	2 g/l
Sulfate de magnésium	0,2 g/l
Sulfate de manganèse	0,05 g/l

Milieu M17

Peptone tryptique de caséine	2,5 g/l
Peptone pepsique de viande	2,5 g/l
Peptone papaïnique de soja	5 g/l
Extrait de levure	2,5 g/l
Extrait de viande	5 g/l

β glycérophosphate de sodium	19 g/l
Sulfate de magnésium	0,25 g/l
Lactose	5 g/l

Les milieux solides sont obtenus par addition de 15 g/l d'agar-agar aux milieux liquides.

2.2. Milieu de production

Le milieu de production a été mis au point et optimisé par nos soins. Il contient essentiellement de l'extrait de jus de datte obtenu à partir de déchets de dattes. Ils s'agit de dattes verreuses, et d'écart de tri, provenant de plusieurs régions phoenicicoles. La préparation de l'extrait de jus de datte est la suivante :

Les dattes sont d'abord lavées puis dénoyautées. L'eau est rajoutée à raison de 2 litres par kilogramme de pulpe de datte. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 heures. Le jus obtenu est centrifugé à 20,000 g pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulotiques. Le surnageant recueilli est utilisé en tant que source de carbone après avoir été dilué aux proportions convenables.

Après stérilisation l'extrait de jus de datte est enrichi en extrait de levure et en sels minéraux. La composition du milieu de production est la suivante :

Sucres de jus de datte (glucose, fructose, saccharose)	Concentrations variables
Extrait de levure	10 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g/l
MnSO ₄ , H ₂ O	0,03 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l
K ₂ HPO ₄	3 g/l
CH ₃ COONa	2 g/l
Tween 80	1ml/l

Le milieu est ajusté à pH6 avec une solution d'ammoniaque 5N.

Dans ce milieu nous faisons toutefois varier les concentrations initiales en sucres de jus de datte et avons testé différentes sources azotées.

2.3. Milieux d'alimentation

Le milieu d'alimentation utilisé pour les fermentations semi-continues et continues est variable d'une fermentation à l'autre. Il contient soit du jus de datte seul, soit du jus de datte supplémenté en extrait de levure et en sels minéraux. Les concentrations précises

seront données dans la partie Résultats lorsque les résultats des fermentations seront exploités.

2.4. Lactosérum déprotéiné

Ce milieu a été utilisé afin de comparer les performances de production d'acide lactique avec celles obtenues sur jus de datte.

Le lactosérum utilisé provient de la société Lactofrance (Baleycourt, France). C'est du lactosérum doux en poudre. Avant utilisation, ce dernier est déprotéiné selon méthode de Schepers *et al.* (2000). Cette méthode consiste à réhydrater le lactosérum dans de l'eau distillée puis le pH est ajusté à 5 avec une solution d'HCl 1N. La solution est ensuite autoclavée 15 minutes à 121°C. Après refroidissement, le précipité (fraction protéique) est séparé par centrifugation à 20,000 g pendant 15 minutes.

3. STERILISATION

La stérilisation des milieux et des solutions est réalisée par autoclavage ou par filtration. Le fermenteur est stérilisé à l'autoclave avec tous ses accessoires et le milieu de production. La stérilisation est effectuée à 121°C pendant 20 minutes. Pour éviter les réactions de brunissement non enzymatique, le jus de datte et les solutions supplémentées (extrait de levure et sels minéraux) sont stérilisés séparément. Les solutions de vitamines sont stérilisées par filtration sur filtres Minisart (0,2 µm).

4. APPAREILS ET PRODUITS CHIMIQUES

Appareils pour culture:

- Fermenteurs Biolafitte et LKB avec leurs systèmes d'agitation, de régulation de la température et du pH,
- Sonde de pH Ingold,
- Module chauffant pour bain-marie Polystat 22 Bioblock,
- Cryostat à circulation Braun,
- Table d'agitation + hôte thermostatée Infors,
- Etuve bactériologique.

Mesures analytiques:

- CLHP Waters,
- Multiskan MCC/340 + Imprimante Epson Lx800,
- pH mètre Corning 250,

- Spectrophotomètre LKB Biochrom Novospec II,
- Spectrophotomètre Spectronic 20 Genesys.

Autres appareils:

- Agitateur magnétique Bioblock,
- Vortex Janke et Kunkel,
- Balance Précisa 1000-3000 D,
- Centrifugeuse réfrigérée Jouan MR1411,
- Hotte à flux laminaire Plastec,
- Pipettes automatiques Gilson,
- Pompes péristaltiques Ismatec Bioblock,
- Autoclave Webeco.

Produits chimiques pour les cultures:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma,
- $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck,
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Merck,
- Extrait de levure, Sigma,
- Tryptone de Soja, Difco,
- Hydrolysate de caséine, Biokar,
- Peptone, Merck,
- Urée, Prolabo,
- Tween 80, Sigma,
- Glycérol, Sigma,
- HCl, Fluka,
- KH_2PO_4 , Merck,
- K_2HPO_4 , Merck,
- NH_4OH , Panreac,
- $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Biokar.

Vitamines:

- Riboflavine, Sigma,
- Acide pantothénique, Sigma,
- Pyridoxine, Sigma,
- Acide folique, Sigma,

- Acide nicotinique, Sigma,
- Biotine, Sigma.

Produits chimiques pour les analyses:

- Kit enzymatique, Sigma pour le dosage du glucose,
- Kit enzymatique, Sigma pour le dosage du lactate,
- NaOH, Prolabo,
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Prolabo,
- $\text{KNa}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Prolabo,
- Bleu de méthylène, Fluka,
- H_2SO_4 , Prolabo.

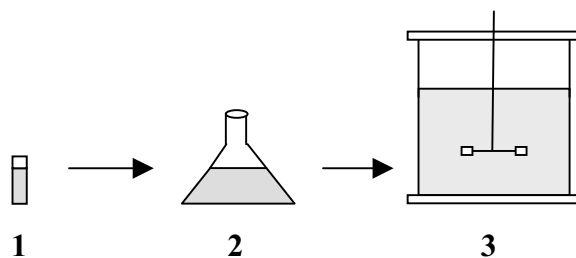
5. METHODES DE FERMENTATION

5.1. Conservation des souches

La conservation des souches à moyen terme est réalisée sur milieu à base de glycérol (glycérol stock). Une culture de la souche *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* est effectuée en milieu liquide MRS et une culture de la souche *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* est effectuée en milieu liquide M17. Après croissance des bactéries jusqu'en phase exponentielle, un volume de glycérol stérile est ajouté à trois volumes de la culture. La suspension bactérienne à 25% de glycérol est ensuite répartie dans des tubes stériles (1 ml) puis congelée à -20°C .

5.2. Propagation de la souche

Les cultures stocks ont été décongelées au fur et à mesure des besoins, puis utilisées. Le tube de conservation sert à inoculer le milieu de préculture. Cette dernière est prise à l'ensemencement en phase de croissance exponentielle (12 heures). Puis le fermenteur est inoculé à raison de 10% (v/v) de manière stérile (**Figure 2.1**).



- 1- Tube de conservation à -20°C
- 2- Préculture (milieu MRS) (38°C, 12 heures)
- 3- Culture en fermenteur (milieu de production)

Figure 2.1. Propagation de la souche (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*).

5.3. Cultures

Les Erlenmeyers ou fermenteurs sont ensemencés avec des précultures dont les bactéries sont en phase exponentielle de croissance.

5.3.1. Culture en Erlenmeyer

Après avoir ajusté le pH à 6, le milieu de culture est réparti à une proportion de 100 ml dans des Erlenmeyers de capacité de 250 ml. Ils sont ensuite stérilisés à 120°C pendant 20 minutes. Le milieu de culture est inoculé à l'aide de préculture à raison de 10% v/v, puis incubé à 38°C sous agitation de 200 rpm.

5.3.2. Culture en fermenteur

5.3.2.1. Description des fermenteurs

Trois types de fermenteurs ont été utilisés lors de ce travail: un fermenteur LKB d'une capacité de 6 litres, un fermenteur LKB de 10 litres et un fermenteur Biolafitte de 2 litres. Ces fermenteurs sont équipés d'un système de contrôle de température, de pH et d'agitation:

- Régulation de l'agitation

L'agitation est assurée par des turbines réglables en hauteur montées sur un axe unique. L'axe d'agitation est entraîné par un moteur et la vitesse d'agitation est commandable par la console d'alimentation et peut varier de 50 à 1500 tours/minutes. Dans notre cas, la vitesse a été fixée à 150 tours/minutes.

- Régulation du pH

Le pH est régulé à 6 par un système PID couplé à une sonde à pH stérilisable (Ingold). L'étalonnage de la sonde est effectué avant stérilisation. La régulation du pH se fait par injection à l'aide d'une pompe péristaltique d'une solution d'ammoniaque 5N.

- Régulation de température

La température est régulée à 38°C. Pour le fermenteur Biolafitte, le liquide de régulation est de l'eau thermostatée à 38°C qui circule en continu dans un circuit propre, en contact avec le volume réactionnel. Le fermenteur LKB est muni d'une sonde chauffante et par circulation d'eau froide.

5.3.2.2. Protocole des fermentations discontinues

Le volume réactionnel est fixé à 1 litre (fermenteur Biolafitte) ou 3 litres (fermenteur LKB). L'inoculum est de 10%. Les conditions de culture sont les suivantes :

- pH maintenu à 6
- Température 38°C
- Agitation 150 rpm

Les prélèvements sont effectués en cours de fermentation. La densité optique est lue immédiatement et le reste de l'échantillon est centrifugé. Les surnageants sont récupérés et congelés, les différents dosages étant réalisés ultérieurement.

5.3.2.3. Protocole des fermentations semi-continues

Les fermentations débutent de la même manière que les cultures discontinues. Les conditions opératoires sont identiques. L'alimentation débute lorsque le glucose du milieu est en voie d'épuisement (24 heures). La concentration et le débit d'alimentation sont variables.

5.3.2.4. Protocole des fermentations continues

Après une première phase de culture en discontinu (15 heures), un système d'alimentation et de soutirage est mis en route. Le volume réactionnel est maintenu constant (3 litres) grâce à une sonde de prélèvement. Le débit et la composition du milieu d'alimentation peuvent varier d'une fermentation à l'autre.

6. METHODES D'ANALYSE

6.1. Estimation de la biomasse

6.1.1. Evaluation de la biomasse par densité optique

La biomasse est évaluée par spectrophotométrie à 620 nm. Une corrélation entre les unités DO mesurées et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec est établie pour le spectrophotomètre utilisé. Lorsque cela est nécessaire les échantillons sont dilués de façon à obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé.

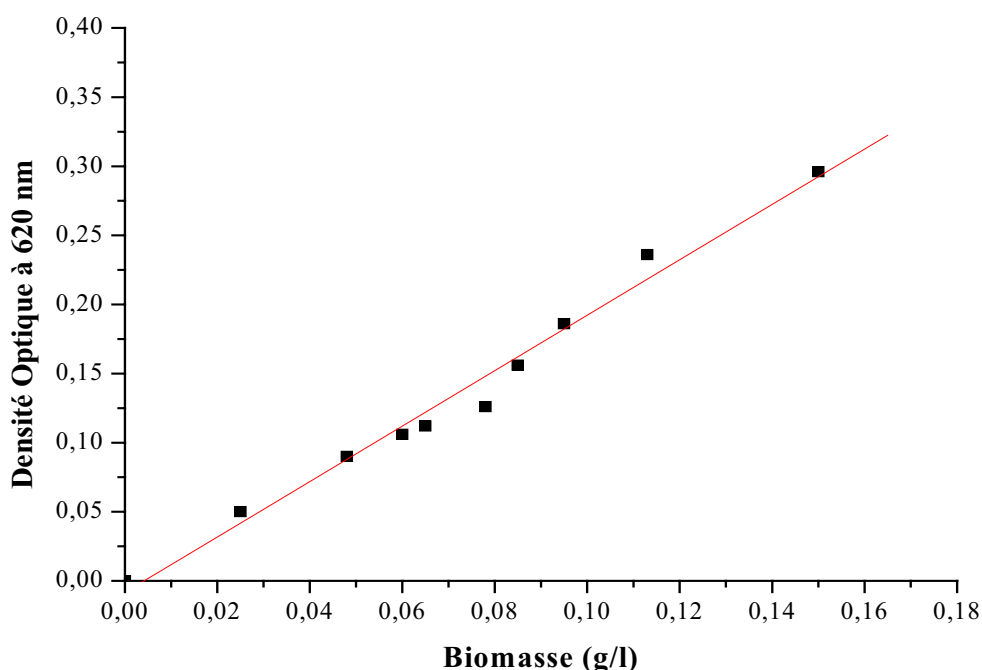


Figure 2.2. Courbe d'étalonnage pour le spectrophotomètre utilisé: densité optique (DO) en fonction de la biomasse (poids sec). Biomasse (g/l) = 0.5 x DO

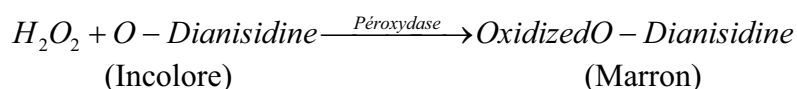
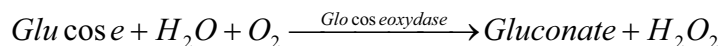
6.1.2. Numération sur milieux gélosés

Les numérations ont lieu par étalement de dilutions de fermentation sur boîte de Pétri dans lesquelles est coulé du milieu MRS ou M17 gélosé dont le pH est fixé à 6. Les prélèvements de milieu de fermentation sont dilués en cascade dans l'eau physiologique. Pour chaque dilution, 0,1 ml de suspension est déposé et étalé sur la surface de la gélose. Trois étalements sont réalisés pour chaque dilution. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 48 heures après lesquels un comptage est effectué.

6.2. Dosage du glucose et du lactate par kit enzymatique

6.2.1. Dosage du glucose

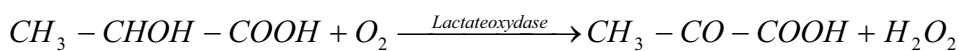
Le dosage se fait par kit enzymatique Sigma. Le dosage est basé sur les deux réactions suivantes :



L'intensité de la couleur marron est mesurée à 450 nm. Cette dernière est proportionnelle à la concentration du glucose, pour des concentrations comprises entre 0,05 et 0,4 g/l. Au-delà de cette concentration, une dilution est nécessaire.

6.2.2. Dosage du lactate

Le dosage est réalisé par kit enzymatique Sigma. L'acide lactique est converti en pyruvate et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la lactate oxydase.



En présence de l' H_2O_2 formé, la peroxydase catalyse l'oxydation du précurseur chromogène pour produire une coloration violette mesurée à 540 nm. L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à la concentration d'acide lactique dans l'échantillon. Pour des concentrations comprises entre 0,2 et 1,4 g/l. Au-delà de cet intervalle une dilution est nécessaire.

6.3. Dosage des sucres (glucose, fructose et saccharose) et du lactate par CLHP

Les sucres de la fermentation (glucose, fructose, saccharose) et l'acide lactique sont dosés par Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP) WATERS (USA). La séparation des différents composés est effectuée au sein de la colonne polypore H (250 x 7 mm) (Bronnlee Labs, USA). En sortie de colonne, deux détecteurs placés en série permettent le suivi des différents composés (réfractomètre différentiel et spectrophotomètre UV à 210 nm). Le dosage est réalisé avec un passeur automatique d'échantillons.

Les paramètres utilisés sont les suivants :

Volume injecté : 10 μ l

Température du four : 65°C

Eluant : H_2SO_4 : 0,04 N

Débit de la pompe : 0,9 ml/mn

6.4. Dosage des sucres réducteurs (méthode Lane-Eynon, 1923)

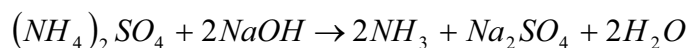
La méthode Lane-Eynon est une méthode volumétrique de détermination des sucres réducteurs totaux. C'est une méthode qui relie, à l'aide d'une table de conversion, une concentration de sucres réducteurs contenus dans un volume de solution requis pour réduire un volume donné de réactif de Fehling.

La méthode est basée sur la capacité des sucres réducteurs de réduire l'hydroxyde cuivrique en oxyde cuivreux. On titre à chaud un volume donné de réactif de Fehling (10 ml) à l'aide de solution de sucres (de jus de datte ou de lactosérum déprotéiné) préalablement hydrolysée. L'indicateur Bleu de méthylène est utilisé pour rendre plus claire la disparition de la couleur bleue du réactif de Fehling (point de virage). Le volume de solution de sucres pour le virage est converti en mg/l de sucres réducteurs à l'aide d'une table de conversion.

6.5. Dosage de l'azote total

L'azote total a été dosé par la méthode Kjeldahl. Ce dosage s'effectue en deux étapes:

1- La minéralisation de l'azote à l'aide d'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur. On passe d'une forme d'azote organique NH_2 à l'état minéral NH_4^+ . Le sulfate d'ammonium obtenu est ensuite déplacé par une solution de soude concentrée.



2- L'ammoniac dégagé se combine instantanément avec la vapeur d'eau, grâce à un système de distillation en hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) qui est récupéré dans une solution d'acide borique contenant un indicateur coloré. Le borate d'ammonium $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$ formé est déplacé par un acide fort (H_2SO_4 0,01N). Il se forme du sulfate d'ammonium (virage du vert au rose). Le volume d' H_2SO_4 versé correspond à l'ammonium contenu dans l'échantillon. On obtient la concentration d'azote (g/l) par la formule suivante:

$$\text{Azote total} = (V_1 - V_0) * 0,14 * \text{dilution}$$

V_1 : volume d' H_2SO_4 versé pour un échantillon

V_0 : volume d' H_2SO_4 versé pour le blanc

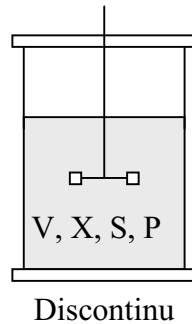
7. Préparation de l'extrait cellulaire

En fin de procédé de production d'acide lactique, il existe une quantité de biomasse à retraiter. L'idée est de réutiliser cette biomasse comme extrait azoté pour substituer la totalité ou une partie de l'extrait de levure utilisé. Pour la réalisation de l'extrait cellulaire, une lyse chimique est utilisée:

Un volume de 200 ml d'une solution d'un concentré de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* est chauffé à 100°C après ajustement du pH à 1 avec de l'acide chlorhydrique (10 N), pendant 2h 30 min. La solution est ensuite filtrée sur papier et le filtrat est récupéré pour le dosage de la quantité d'azote.

8. Exploitation des données expérimentales

8.1. Réacteur discontinu



V : volume du milieu (l)

X : concentration en biomasse (g.l⁻¹)

S : concentration en substrat (g.l⁻¹)

P : concentration en produit (g.l⁻¹)

A partir des cinétiques de croissance, de consommation des substrats et de formation de produits, il est possible de calculer les différentes vitesses à chaque instant t en déterminant la dérivée de la variable considérée par rapport au temps.

La vitesse spécifique instantanée de chaque variable (X, S, P) est définie par le rapport entre la dérivée de la variable considérée par rapport au temps et la valeur de la biomasse X à cet instant.

Les bilans matières de la biomasse X, du substrat S et du produit P, donnent :

$$r_X''' = \frac{dX}{dt}$$

$$r_S''' = -\frac{dS}{dt}$$

$$r_P''' = \frac{dP}{dt}$$

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

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

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

Avec :

r_X''' : vitesse de croissance ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_S''' : vitesse de consommation du substrat ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_P''' : vitesse de production d'un produit ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

μ : vitesse spécifique de croissance (h^{-1})

q_S : vitesse spécifique de consommation du substrat ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

q_P : vitesse spécifique de production d'un produit ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Rendements:

Les rendements globaux $Y_{X/S}$ et $Y_{P/S}$ sont définis comme les rapports de masse de biomasse (poids de cellules sèches) (X) ou de métabolites formés (P) par la masse de substrat carboné consommé (S) depuis le début de la fermentation:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \qquad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

avec :

S_0 : concentration de substrat dans le fermenteur à $t = 0$ (g.l^{-1})

P_0 : concentration de produit dans le fermenteur à $t = 0$ (g.l^{-1})

$Y_{X/S}$: rendement apparent de production de biomasse à partir du substrat (g.g^{-1})

$Y_{P/S}$: rendement apparent de production de produit à partir du substrat (g.g^{-1})

Productivité volumétrique:

La productivité volumétrique est la quantité de produit par unité de temps et de volume du fermenteur

$$\delta = \frac{P - P_0}{d}$$

avec:

d : durée de la fermentation (h)

δ : productivité volumétrique ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Productivité spécifique:

La productivité spécifique est la quantité de produit par unité de temps et par gramme de biomasse

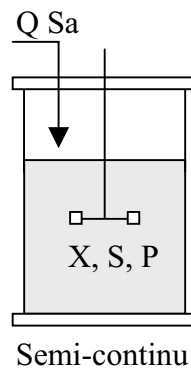
$$\Delta = \frac{P - P_0}{X} \cdot \frac{1}{d}$$

Avec :

d : durée de la fermentation (h)

Δ : productivité spécifique ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

8.2. Réacteur semi-continu



Q : débit d'alimentation ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$)

S_a : concentration en substrat dans la solution d'alimentation ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

X : concentration en biomasse ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

S : concentration en substrat dans le milieu de fermentation ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

P : concentration en produit ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)

Dans ce cas, le volume du fermenteur V (en l) varie au cours du temps. Le débit d'alimentation en substrat Q (en $\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$) est exprimé par :

$$Q = \frac{dV}{dt}$$

Les bilans matière de la biomasse X , du substrat S et du produit P , donnent les vitesses suivantes:

$$r_X^m = \frac{Q}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

$$r_S^m = \frac{Q}{V} \cdot (S_a - S) - \frac{dS}{dt}$$

$$r_P^m = \frac{Q}{V} \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

Les rendement globaux sont donnés par:

$$Y_{X/S} = \frac{X_t V_t - X_0 V_0}{S_0 V_0 - S_t V_t + (V_t - V_0) S_a}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t V_t - P_0 V_0}{S_0 V_0 - S_t V_t + (V_t - V_0) S_a}$$

La productivité volumétrique est donnée par:

$$\delta = \frac{P_t V_t - P_0 V_0}{(t_t - t_0) V_t}$$

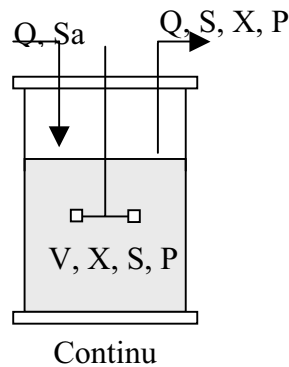
P_t : concentration du produit au temps t

V_t : volume du fermenteur au temps t

V_0 : volume initial du fermenteur

P_0 : concentration en produit initiale

8.3. Réacteur continu



Q : débit d'alimentation et de soutirage (l.h^{-1})

S_a : concentration en substrat dans la solution d'alimentation (g.l^{-1})

V : volume de milieu (l)

X : concentration en biomasse (g.l^{-1})

S : concentration en substrat dans le milieu de fermentation (g.l^{-1})

P : concentration en produit (g.l^{-1})

Les bilans matière de la biomasse X , du substrat S et de produit P donnent :

Bilan biomasse :

$$r_X^m = \frac{Q}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

A l'état d'équilibre, nous obtenons:

$$r_X''' = D.X$$

Comme $r_X''' = \mu.X$, nous obtenons donc:

$$D = \mu$$

Bilan substrat:

$$r_S''' = \frac{Q}{V}(S_a - S) - \frac{dS}{dt}$$

A l'état d'équilibre, nous obtenons:

$$r_S''' = \frac{Q}{V}(S_a - S)$$

Bilan produit:

$$r_P''' = \frac{Q}{V}.P + \frac{dP}{dt}$$

A l'état d'équilibre, nous obtenons:

$$r_P''' = D.P$$

Rendements:

A l'état d'équilibre les rendements globaux de bioconversions sont donnés par:

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S_a - S} \qquad Y_{P/S} = \frac{P}{S_a - S}$$

Productivités volumétriques:

$$\delta_P = P.D$$

$$\delta_X = X.D$$

avec:

D : taux de dilution (h^{-1})

δ_P : productivité volumétrique d'acide lactique ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

δ_X : productivité volumétrique de biomasse ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Productivité spécifique:

$$\Delta = \frac{P}{X}.D$$

avec:

D : taux de dilution (h^{-1})

Δ : productivité spécifique ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

CHAPITRE III

Cultures discontinues

1. Etudes de plusieurs sources azotées de faibles coûts lors de cultures en mode discontinu
2. Production d'acide lactique sur jus de datte en culture pure et mixte par *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*
3. Effet des sources de carbone pures et mélangées sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus*

- CHAPITRE III -
Cultures discontinues : 1. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin
supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei*
subsp. *rhamnosus*

SOMMAIRE

Abstract	94
1. Introduction	94
2. Methods	95
2.1. Microorganism	95
2.2. Culture conditions	96
2.3. Extraction of date juice sugar	96
2.4. Vitamins and nitrogen sources	96
2.5. Analytic methods	97
3. Results and discussion	97
3.1. Sugar utilization	97
3.2. The effect of yeast extract supplementation on growth and lactic acid production	97
3.3. Effect of different nitrogen sources supplementation	99
3.4. Effect of B vitamin complex and different nitrogen sources supplementation	100
3.5. Fermentor operations using ammonium sulphate with vitamin supplementation .	100
4. Conclusion	103
References	103

1. Etudes de plusieurs sources azotées de faibles coûts lors de cultures en mode discontinu

Des études préliminaires ont montré que le jus de datte est favorable à la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Cependant le jus de datte seul en tant que source de carbone n'était pas suffisant et qu'il est nécessaire de le compléter avec une source azotée. Dans la littérature, la quasi-totalité des auteurs utilisent l'extrait de levure pour améliorer la croissance et la production d'acide lactique, mais ce produit est onéreux en production industrielle et il serait plus intéressant de tester d'autres sources plus économiques.

Cette partie de travail a comme objectifs les points suivants :

- Améliorer les performances de production d'acide lactique en testant différents types de sources azotées.
- Tenter de trouver une source d'azote efficace et de faible coût.
- Déterminer si une supplémentation en vitamines est nécessaire à la croissance et à la production d'acide lactique.
- Trouver une alternative économique pour diminuer au maximum les coûts liés à l'ajout de co-substrat.

Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation
of date juice on lactic acid production
by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

Aicha Nancib ^a, Nabil Nancib ^a, Djalal Meziane-Cherif ^a, Abdelhafid Boubendir ^a,
Michel Fick ^b, Joseph Boudrant ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria

^b LSGC-CNRS-ENSAIA, BP, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

The use of date juice as substrate for lactic acid production was investigated. Various nitrogen sources were compared with yeast extract for efficient lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. Among different nitrogen sources added to date juice (yeast extract, ammonium sulfate, tryptic soy, urea, peptone, and casein hydrolysate), yeast extract was the most efficient. The effect of yeast extract could have been due to its B vitamin content. The addition of five B vitamins at less than 25 mg/l to date juice with any nitrogen source enhanced lactic acid production to some extent, except for date juice with yeast extract or urea or peptone. The most significant increase was obtained with ammonium sulfate. Half of the yeast extract content (10 g/l) in a supplemented could be replaced by a mixture of B vitamins at less than 25 mg/l, and ammonium sulfate at 2.6 g/l with no significant decrease in lactic acid production.

Key words : Date juice, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*, Lactic acid, Nitrogen source, B vitamins supplementation.

1. Introduction

A major problem encountered in the industrial fermentation of lactic acid bacteria is the need for assimilable nitrogen and vitamin supplementation to sustain growth (Leh and Charles, 1989). Yeast extract has been used in many studies as a supplement (Aeschlimann and Von Stockar, 1990; Mehaia and Cheyan, 1991; Roy *et al.*, 1986), but its cost prevents its use in large quantities in industrial processes for lactic acid production. To develop an economically viable industrial process it is essential to consider simultaneously productivity, residual sugar concentration,

supplementation level and cost. An alternative in the development of an industrial process for the production of lactic acid from whey is to minimise yeast extract supplementation or to replace yeast extract with less expensive supplements (Cheriani *et al.*, 1992; Leh and Charles, 1989; Lund *et al.*, 1992; Hujanen and Linko, 1996; Yoo *et al.*, 1997).

Furthermore, most studies on lactic acid production focus on using whey (Mehaia and Cheryan, 1991; Aeschlimann and Von Stockar, 1989; Cheriani *et al.*, 1992; Lund *et al.*, 1992; Roukas and Kotzekidou, 1991; Roy *et al.*, 1986) and synthetic media containing pure lactose, sucrose or dextrose (Gonçalves *et al.*, 1991; Heriban *et al.*, 1993, Martinkova *et al.*, 1991). As mentioned earlier (Nancib *et al.*, 1997), Algeria holds a leading position among date-producing countries. However, a large quantity of mature dates (60,000 tons/year) is unfortunately lost for various reasons. Thus, date-products could be considered as suitable agricultural materials for the production of different compounds. In fact, some investigations have been carried on the production of oxytetracycline (Abou-Zeid *et al.*, 1993), and baker's yeast (Jalaluddin *et al.*, 1993; Nancib *et al.*, 1997). The value of date products lies in their content of materials such as sugars, amino acids and minerals (Abou-Zeid *et al.*, 1991).

In the light of the available literature, the date is a convenient raw material for lactic acid fermentation since it contains a high concentration of sugar (Nancib *et al.*, 2001). Moreover, the date is abundant, cheap and requires little handling before fermentation. Hence, this paper describes the production of lactic acid from date juice by using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in order to minimise yeast extract supplementation by partial replacement with less expensive nitrogen sources and B vitamin complex.

2. Methods

2.1. Microorganism

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* NRRL-B445, a homofermentative lactic acid producer, was used. Stock cultures (1 ml) were stored at -20°C in *Lactobacilli* MRS medium with 25 % (v/v) glycerol.

2.2. Culture conditions

The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture (1 ml) to an Erlenmeyer flask containing 100 ml of liquid MRS medium for preculture. The flask was subsequently incubated at 38°C for 12 h, the time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase. Then, the culture in Erlenmeyer flasks or fermentor containing the production medium was inoculated. A 10 % inoculum grown in the MRS medium was used in all fermentations. Flask experiments were carried out in 250 ml-Erlenmeyer flasks containing 100 ml of production medium. A 6.0 l jar fermentor (LKB) was employed for cultivation operations with an initial culture volume of 3.0 l. The agitation speed and culture temperature were controlled at 150 rpm and 38°C. Due to the fact that the used strain is facultative anaerobic, there is no need for air-sparging. The medium for the cultures has the following composition: glucose of date juice, 50 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/l; KH_2PO_4 , 3 g/l; K_2HPO_4 , 3 g/l; sodium acetate, 2 g/l; tween 80, 1 ml/l and various nitrogen sources and B vitamins. The culture pH in the fermentor was controlled at 6.0 by adding ammonia solution (8 N). All the media were sterilised at 121°C for 15 min except for the vitamin solution, which was sterile-filtered with 0.2 μm -cellulose acetate membrane. The solutions of complex nitrogen sources were sterilized separately.

2.3. Extraction of date juice sugar

The method used was adapted from Nancib *et al.* (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting and tap water added at a ratio of two parts of water to one part of dates (V/W). The mixture was heated at 80°C for 2 hours with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min to separate the cellulosic debris. The supernatant was recovered and used essentially as the carbon source in the fermentation medium. The sugar content of the collected supernatant was determined. Immediately and prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice was diluted to the desired concentration of sugar. As is explained below, it is enough to determine only glucose in order to have an estimation of the used sugars.

2.4. Vitamins and nitrogen sources

Five vitamins: folic acid, riboflavin, niacin, Cad-pantothenate, and pyridoxine-HCl were purchased from Sigma. Six nitrogen sources: yeast extract, ammonium

sulfate, tryptic soy, urea, peptone and casein hydrolysate purchased locally, were used in this study.

2.5. Analytic methods

Biomass concentration was estimated by optical density measurement at 620 nm and calibrated to the cell dry weight. Lactate and glucose were measured using enzymatic kit from Sigma.

3. Results and discussion

3.1. Sugar utilization

Date coat contain the following sugars: glucose, fructose and saccharose (Booij *et al.*, 1993). During fermentation, as for the utilization of these sugars it was noted that sucrose is not metabolized and that fructose is utilized parallel to glucose. This is why, for reasons of simplification, only glucose has been analyzed during the performed assays.

3.2. The effect of yeast extract supplementation on growth and lactic acid production

To improve lactic acid production and decrease the downstream processing cost, date juice was supplemented with varying concentrations (0, 10, and 20 g/l) of yeast extract. In all cases, the initial glucose level of date juice was kept at 50 g/l. Supplementation with yeast extract has increased lactic acid production compared with unsupplemented date juice (Fig.1). *Lactobacilli* have complex nutrient requirements (Cox *et al.*, 1977), therefore, it is essential to supplement date juice with some commercially available growth supplements such as yeast extract, casamino acids, etc (Roy *et al.*, 1986).

As shown in Fig.1, the final cell mass and lactic acid productions increased significantly with increasing initial yeast extract concentration up to 10 g/l. The supplementation of date juice with yeast extract concentrations greater than 10 g/l increased less significantly lactic acid production. Hence, the supplementation of date juice with 10 g/l yeast extract was selected to avoid a limitation in essential growth factors for the bacteria.

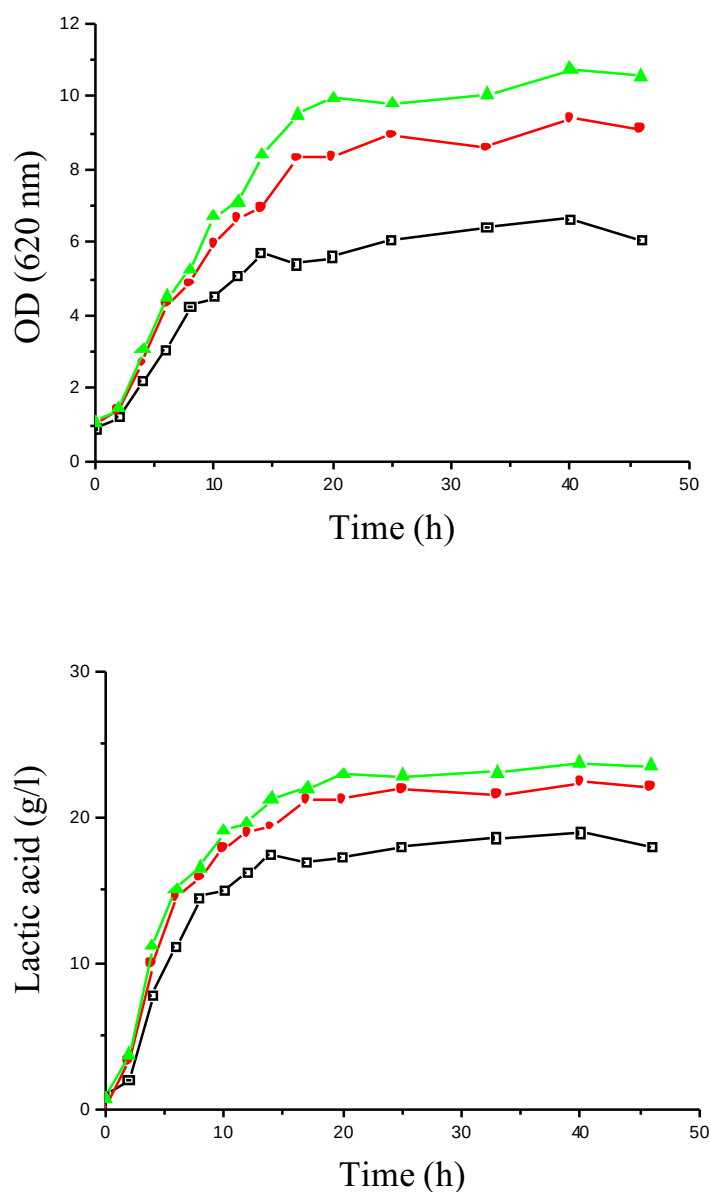


Fig.1. The effect of initial yeast extract concentration on cell growth and lactic acid production: (■) 0 g/l; (●) 10 g/l; (▲) 20 g/l

However, the high cost of yeast extract (about six times more expensive than ammonium sulfate) has a negative impact on the economics of its use in industrial scale processes. To improve the economic parameters of lactic acid production by fermentation, comparable and cheaper nitrogen were substituted with yeast extract (10 g/l) on equivalent nitrogen bases using glucose of date juice with 50 g/l initial glucose concentration.

3.3. Effect of different nitrogen sources supplementation

The effects of supplementing date juice with different nitrogen sources such as yeast extract, ammonium sulfate, tryptic soy, urea, peptone and casein hydrolysate on the performance of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* were compared. The amount of each supplementation was in order to reach a nitrogen concentration of 10 g/l yeast extract equivalent. We used the concentrations of lactic acid produced during 40 h of fermentation as reference for comparison.

As can be seen in Table 1, none of non-yeast extract nitrogen sources gave lactic acid concentrations as high as that for yeast extract. On the other hand, ammonium sulfate seems to be good alternative to yeast extract. Urea gave the lowest concentrations of lactic acid (14.1 g/l). Note that casein hydrolyzate and ammonium sulfate gave similar results but since ammonium sulfate is less expensive (about six time less cheaper than casein hydrolysate), the latter compound was selected for the forthcoming experiments. On the basis of previous results, it is clear that yeast extract is the best supplement for efficient lactic acid production. This could be attributed to its B complex vitamins as indicated by Cheng *et al.* (1991). Therefore, a set of experiment was carried out to study the effect of B vitamin complex on the performance of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in date juice supplemented with different nitrogen sources.

Table 1. Lactic acid production for various sources of nitrogen and B vitamins during 40 h of flask culture (initial glucose concentration: 50 g/l)

Nitrogen source ^a (g/l)		Lactic acid concentration (g/l)		Enhancement by vitamins (%)
		Without vitamins	With vitamins ^b	
Yeast extract	10.0	24.8	24.3	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.2	19.0	23.7	24.46
Tryptic soy	12.6	18.0	20.3	12.94
Urea	2.4	14.1	11.6	-
Peptone	6.9	16.0	14.8	-
Casein hydrolysate	14.6	19.1	22.5	17.95

^aThe amount of each nitrogen source was set as that which yielded a nitrogen concentration of 10 g/l yeast extract equivalent.

^bThe concentration of B vitamins added, per liter of medium: folic acid, 1.3 µg; riboflavin, 1 mg; niacin, 10 mg; Cad-pantothenate, 4 mg; and pyridoxine-HCl, 0.5 mg.

3.4. Effect of B vitamin complex and different nitrogen sources supplementation

B vitamin complex was added to date juice supplemented with different nitrogen sources (ammonium sulfate, urea, peptone, casein hydrolysate). Among the vitamins present in yeast extract, folic acid, niacin, pantothenic acid, pyridoxine, and riboflavin are essential B vitamins for supporting the growth of *Lactobacillus casei* (Amrane and Prigent, 1994). The amounts of these vitamins present in 10 g/l of yeast extract were calculated (Yoo *et al.*, 1997) and supplemented together with nitrogen sources as shown in Table 1. The addition of these vitamins enhanced the lactic acid production to some extent in all cases except for the nitrogen sources yeast extract, urea, and peptone. The most significant increase was obtained with ammonium sulfate. The enhancement by vitamins is 24.5%. Casein hydrolysate gave the second highest increase after ammonium sulfate. In the case of urea, there was no significant enhancement of lactic acid production by vitamin supplementation. Although the most significant increase was obtained with ammonium sulfate, the production was not maximum. Therefore, we decided to use a combination of yeast extract, ammonium sulfate and B vitamin complex.

3.5. Fermentor operations using ammonium sulfate with vitamin supplementation

After these preliminary results obtained in Erlenmeyer, a few experiments were carried out in the fermentor varying the source of nitrogen, the percentage of nitrogen in the medium remaining constant.

To confirm aforementioned performance of ammonium sulfate, controlled fermentor operations were carried out for 40 h (Fig. 2). A fermentation with 10 g/l yeast extract without vitamin supplementation was first conducted as the reference experiment. Most of the initially existing 50 g/l of glucose of the date juice was completely utilized and a lactate concentration of 80 g/l was obtained. When 5.2 g/l of ammonium sulfate concentration was used with vitamin supplementation equivalent to 10 g/l yeast extract, glucose could not be fully converted to lactate and a much lower lactate concentration of 45 g/l was obtained.

Finally, to determine whether the amount of yeast extract supplementation could be reduced without a decrease in the production rate, it was decided to partially replace yeast extract by vitamin and a nitrogen source ammonium sulfate as shown by the results of the fermentation indicated on Fig. 2. When half of the yeast extract was substituted by 2.5 g/l ammonium sulfate without vitamin, both cell growth and

production of lactic acid were markedly lower than the case of 10 g/l yeast extract as the only source of nitrogen and growth factors. However, there was a light difference in production rate when supplemented together with B vitamins.

So, we have confirmed that ammonium sulfate is a satisfying alternative and we have determined the feasibility of reducing yeast extract supplementation by partial replacement of yeast extract with less expensive nitrogen sources and pure vitamins. Considering the quality of B vitamins in the above experiments, the cost of supplementing medium with these vitamins is negligible compared with the cost of nitrogen sources.

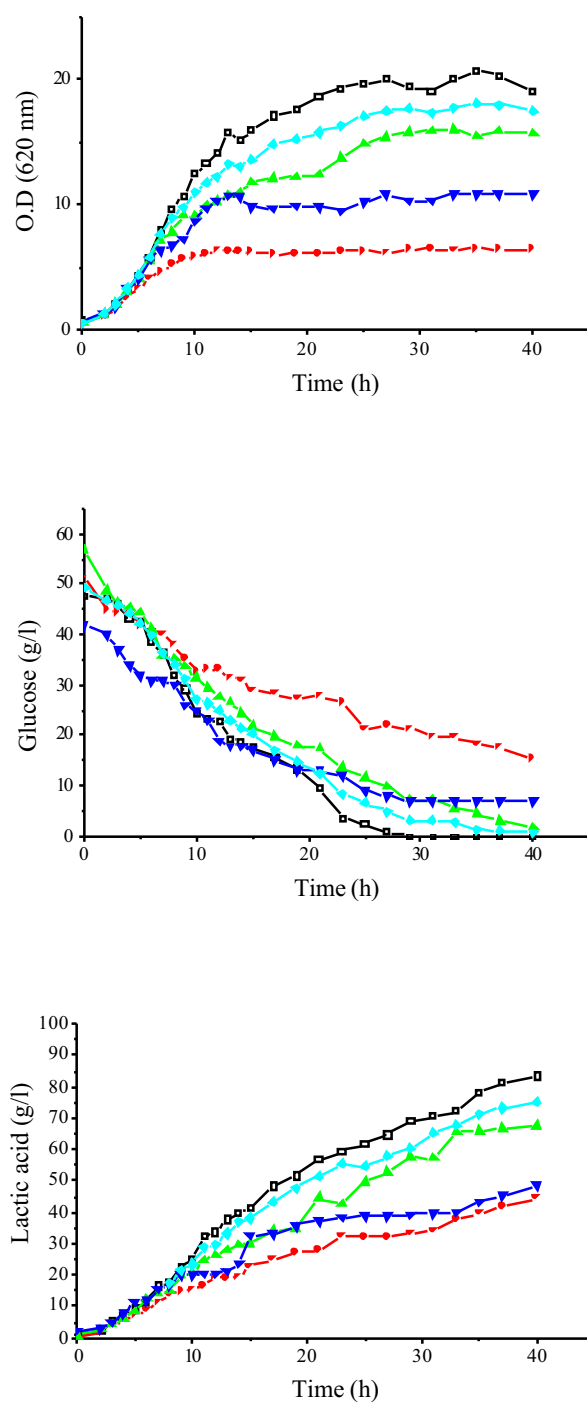


Fig. 2. Comparative fermentations on the additive effect of vitamin B complex in date juice supplemented with (NH₄)₂SO₄ on the dry weight of, substrate use efficiency, and lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus*: (■) yeast extract 10 g/l; (◆) yeast extract 5 g/l, + (NH₄)₂SO₄ 2.6 g/l + vitamins; (▲) yeast extract 5 g./l + (NH₄)₂SO₄ 2.6 g/l; (▼) (NH₄)₂SO₄ 5.2 g/l+ vitamins; (●) (NH₄)₂SO₄ 5.2 g/l.

4. Conclusion

This study suggested that date juice could provide useful basis for lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. This production could be increased by supplementing date juice with nitrogen sources. Yeast extract clearly showed the greatest enhancing effect on lactic acid production. These experimental results suggest that it is possible to substitute part of yeast extract with less expensive nitrogen sources, ammonium sulfate, and B vitamin complex to reduce yeast extract supplementation without a significant decrease in the lactic acid production rate.

Acknowledgments

This work was supported by the accord_programme No. COMDU 502 of Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective (CMEP) between France and Algeria.

References

- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1991. The formation of oxytetracycline in date-coat medium. *Biores. Technol.* **37**, 179-184.
- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1993. Utilization of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **58**, 77-79.
- Aeshlimann, A., Von Stockar, U., 1989. The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Biotech. Lett.* **11**, 195-200.
- Aeshlimann, A., Von Stockar, U., 1990. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 398-402.
- Amrane, A. and Prigent, Y., 1994. Lactic acid production from lactose in batch culture : Analysis of the data with the help a mathematical model ; relevance for nitrogen source and preculture assesement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 644-649.
- Booij, I., Al-Wandawi, H., Al-Adhami, L., 1993. Date technology in Iraq. In: *Proc. First Symp. On the Date Palm*, Saudi Arabia, 23-26 March, King Faical University Arabia, pp. 754-756.

- Cheng, P., Muller, S., Bajpai, R., Lannotti, E.L., 1991. Lactic acid production from enzyme thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. J. Ind. Microbiol. **7**, 27-34.
- Cheriani, L., Mara, L., Tabacchioni, S., 1992. Influence of growth supplement on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**, 461-464.
- Cox, G.C., Mac Bean, R.D., Chandler, G., 1977. Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate. Aust. J. Dairy Technol. **32**, 19-22.
- Gonçalves, L.M.D., Xavier, A.N.R.B., Almada, J.S., Carronodo, M.J.T., 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. Enz. Microb. Technol. **13**, 314-319.
- Heriban, V., Sitkey, V., Sturdik, E., Matus, P., 1993. Nutrition and broth alterations in the lactic acid fermentation. Acta Biotechnol. **35**, 283-288.
- Hujanen, M., Linko, Y.Y., 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**, 307-317.
- Jalaluddin, A., Abulnaja, K.O., Kumosani, T.A., Abou-Zeid, A.A., 1995. Utilization of Saudi date sugars in production of baker's yeast. Biores. Technol. **53**, 63-66.
- Leh, M.B. Charles, M., 1989. The effect of whey protein hydrolysates on the lactic acid fermentation. J. Ind. Microbiol. **4**, 71-75.
- Lund, B., Norddahl, B., Ahring, B., 1992. Production of lactic acid from whey using hydrolyzed whey protein as nitrogen source. Biotech. Lett. **14**, 851-856.
- Martikova, L., Machek, F., Ujcova, E., Kolin, F., Zajicek, J., 1991. Effect of age, amount of inoculum and inoculation medium composition and lactic acid production from glucose by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **36**, 246-248.
- Mehaia, M.A., Cheryan, M., 1991. Fermentation of date extrats to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. Enzyme Microb. Technol. **13**, 257-261.
- Nancib, N., Ghoul, M., Larous, L., Nancib, A., Adimi, Remmal, M. Boudrant, J., 1999. Use of date products in production of the thermophilic dairy strain *Streptococcus thermophilus*. Biores. Technol. **67**, 291-295.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., and Boudrant, J., 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Biores. Technol. **78**, 149-153.

Nancib, N., Nancib, A., Boudrant, J., 1997. Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. Biores. Technol. **60**, 67-71.

Roukas, T. and Kotzekidou, P., 1991. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. Enz. Microb. Technol. **13**, 33-38.

Roy, D., Goulet, J., LeDuy, A., 1986. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**, 206-213.

Yoo, I.K., Cheng, N.N., Lee, E.G., Cheng, Y.K., Moon, S.H., 1997. Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. J. Fermentation Bioeng. **84** (2), 172-175.

2. Production d'acide lactique sur jus de datte en culture pure et mixte par *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*

Les procédés utilisant des cultures mixtes sont complexes. Ils ont été utilisés dans plusieurs procédés de fermentation tels que la production d'éthanol, d'acide aspartique, d'acide succinique et aussi d'acide lactique. Cependant, ce système n'est pas encore utilisé à l'échelle industrielle à cause de la délicate maîtrise et des difficultés rencontrées pour une bonne maîtrise et l'optimisation des paramètres des conditions de culture tels que la température, la demande en oxygène, le pH, la composition du milieu, etc.

Très peu de travaux concernant la production de l'acide lactique en culture mixte ont été développés (Kurosawa *et al.*, 1988; Özen et Özilgen, 1992; Roukas et Kotzekidou, 1991; 1998). C'est pourquoi nous avons pensé qu'il était intéressant de tester la production d'acide lactique en culture mixte en utilisant *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. C'est ce que décrit le projet de publication qui suit.

- CHAPITRE III -

Cultures discontinues : 2. Lactic acid from date juice extract with single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*

SOMMAIRE

Abstract	108
1. Introduction	108
2. Materials and methods	109
2.1. Organisms and culture conditions	109
2.2. Date juice extract	110
2.3. Production medium	110
2.4. Fermentation conditions	110
2.5. <i>Lb. casei</i> and <i>Lc. Lactis</i> cell numeration	111
2.6. Analysis	111
3. Results	111
3.1. Temperature effect on growth rate and lactic acid production	111
3.2. Effect of inoculum composition on mixed cultures	112
3.3. Sugars utilization	113
3.4. Lactic acid production	115
3.5. Biomass production	115
4. Discussion	117
References	119

Production of lactic acid from date juice extract with single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*

Aicha Nancib ^a, Nabil Nancib ^a, Joseph Boudrant ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria

^b LSGC-CNRS-ENSAIA, BP, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

The production of lactic acid from date juice by single and mixed cultures of *Lb. casei* and *Lc. lactis* was investigated. In the present conditions the highest lactic acid concentration (60 g.l⁻¹) has been obtained with of mixed culture of both strains while in single culture fermentations of *Lb. casei* or *Lc. lactis*, the obtained concentrations were only 53 g.l⁻¹ and 46 g.l⁻¹ respectively. The total percentages of glucose and fructose utilized with pure *Lb. casei* are of were 82% and 94%, whereas these corresponding to single *Lc. lactis* were 94% and 60%, respectively. In the case of mixed culture, the total percentages of glucose and fructose utilized were found equal to 96% and 100% respectively, that is to say higher. These results show that the mixed culture gave better results than single cultures regarding lactic acid production and sugars utilization. The reason may be synergistic associations arising in mixed cultures.

Keywords: Lactic acid; date juice; *Lb. casei*; *Lc. lactis*; single and mixed cultures

1. Introduction

Lactic acid is considered as a very important chemical compound since it has significant applications in pharmaceuticals, cosmetics and in the food industry (Göksungur et Güvenç, 1997). Indeed new applications, such as degradable plastics made from poly(lactic) acid, have the potential to greatly expand the market for lactic acid, if more economical processes could be developed (Payot *et al.*, 1999). Glucose, maltose, lactose, and sucrose from cheap raw materials such as cane and beat molasses, sugar starch wastes, whey, have been used as substrates for the fermentative production of lactate (Vic kroy, 1985; Atkinson and Mavituna, 1991). Whey and molasses are being used in places where they are produced in large amounts.

As mentioned earlier (Nancib *et al.*, 1997), Algeria produces different varieties of dates with an annual production of over 300.000 tons. However, about 20 % of the

production is lost due to over-ripening and improper handling, processing, and marketing. Utilization of poor-quality dates and date by-products in bakery and ice-cream products, in the production of caramel color, alcohol, vinegar, single-cell protein (Mehaia, 1991), oxytetracycline (Abou-Zeid *et al.*, 1993), baker's yeast (Jalaluddin *et al.*, 1995; Nancib *et al.*, 1997), and lactic acid (Nancib *et al.*, 2001) has been studied. Dates contain large amounts of reducing sugars, especially glucose, and fructose at levels of (73 – 83%) (dry basis). The date also contain protein, lipid, fibre, mineral elements and some vitamins (Abou-Zeid *et al.*, 1991). Thus making date extracts quite suitable as feedstock for fermentation.

Mixed cultures of lactic acid are currently used in the dairy industry for manufacturing cheeses and fermented milks. The existence of symbiotic relationship among various bacteria has been clearly demonstrated (Bautista *et al.*, 1966; Galesloot *et al.*, 1968; Monn and Reinbold, 1976; Pette and Lolkema, 1950). Only a few reports concern the production of lactic acid in mixed culture from starch, nonfat dry milk, and whey permeate (Kurosawa *et al.*, 1988; Özen et Özilgen, 1992; Roukas and Kotzekidou, 1991; 1998). Complex mixed cultures have also been used in several fermentation processes, e.g., the production of ethanol, aspartic acid, and succinic acid from glucose (Roukas and Kotzekidou, 1998). However, mixed cultures have apparently not been used yet on an industrial scale. Because in mixed cultures the two strains used do not always have similar optimum culture conditions for pH, temperature, nutrients, oxygen demand, etc., it is very difficult to establish optimum and stable conditions for a mixed culture in a single bioreactor.

Lactic acid production from date juice extract by mixed culture has not been until now investigated. In this study, date juice containing glucose and fructose was used as substrate for production of lactic acid by single and mixed culture system containing *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* in batch culture.

2. Materials and methods

2.1. Organisms and culture conditions

The organisms used in the experiments were *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* NRRL-B445 obtained from DSM (Germany) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 obtained from collection of bacterial strains of Institut Pasteur (France).

Lc. lactis and *Lb. casei* were propagated in M17 broth and MRS broth at 30°C. After incubation, the broth containing 5.3×10^8 cells ml⁻¹ of *Lb. casei* or 4.6×10^8 cells ml⁻¹

of *Lc. lactis*. The inoculum of growth cultivated from cultures in the logarithmic phase of growth (13 h), cultivated in 100 ml MRS broth or M17 medium.

2.2. Date juice extract

The method used was adapted from Nancib et al. (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting. Tap water added at a ratio of two parts of water to one part of dates (by weight). The mixture was heated at 80°C for 2h with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min to separate the cellulosic debris, while the supernatant was essentially as the carbon source in the fermentation medium. Immediately prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice was diluted to the desired concentration of sugars. Sugars content of the collected supernatant solution consisted of glucose and fructose.

2.3. Production medium

The production medium consisted of 1l date juice containing glucose 50 g.l⁻¹ and fructose 40 g.l⁻¹. The medium was sterilized at 121°C for 20 min. After cooling, the date juice was supplemented with yeast extract, 10 g.l⁻¹; MgSO₄ 7H₂O, 0.5 g.l⁻¹; MnSO₄ H₂O, 0.03 g.l⁻¹; KH₂PO₄, 3 g.l⁻¹; K₂HPO₄, 3 g.l⁻¹; CH₃COONa 3H₂O, 2 g.l⁻¹ and Tween 80, 1 ml/l (the solutions of nutrients were sterilized separately).

2.4. Fermentation conditions

Fermentations were carried out in Erlenmeyer flasks or fermentor. Flasks experiments were carried out in 250 ml-Erlenmeyer flasks containing 100 ml of production medium. The cultures were incubated at four controlled temperatures (30°C, 32°C, 34°C and 36°C) for 12 h under agitation at 150 rpm. The cultures were also tested at different inoculum composition [5% , 10%, 20%, 30%, 40%, 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis*] using 10% (v/v) inocula of *Lb. casei*/*Lc. lactis* at 30°C. Single and mixed culture were performed as batch fermentations in a 2 l stirred tank fermentor (Biolafite, France) with a working volume of 1l. The fermentor was equipped with temperature, agitation and pH controllers. The pH probe (Ingold) was sterilized in situ. Temperature was controlled at 30°C and the agitation speed at 200 rpm. The pH was maintained at 6.0 by automatic addition of 5N NH₄OH.

The production medium was inoculated with 100 ml inoculum of *Lb. casei* or *Lc. lactis*. In the case of the mixed culture, the medium was inoculated with 50 ml inoculum of each culture.

2.5. *Lb. casei* and *Lc. lactis* cell numeration

The number of living cells was determined by plate counting. *Lb. casei* was cultivated on MRS agar, *Lc. lactis* on M 17 agar, and mixed cultures on both MRS and M17 agar at 30°C for 48 h. The number of colonies formed were counted if they numbered between 30 and 300, as indicated by Roukas and Kotzekidou (1991).

2.6. Analysis

The fermentation broth was centrifuged at 20,000 g for 10 min and the supernatant was used for the determination of lactic acid and residual glucose and fructose. Lactic acid and residual glucose and fructose concentrations were determined by HPLC equipped with an refractive index detector (Waters,USA). The column used was a Polypore H (250 x 7 mm) (Bronnlee labs, USA) operated at 65°C using 0.04 N H₂SO₄ as eluent at a flow rate of 0.9 ml/min.

3. Results

3.1. Temperature effect on growth rate and lactic acid production

In order to find out the best temperature for mixed culture of *Lb. casei* and *Lc. lactis*, the optimum temperatures of the corresponding single cultures were determined. For this they were incubated at 30°C, 32°C, 34°C and 36°C. The corresponding assays were performed in Erlenmeyer flasks for 12h (time corresponding to the stationary phase). The results are shown in Table 1. At lower (30°C) temperature, *Lb. casei* and *Lc. lactis* showed a similar maximum specific growth rate 0.15 h⁻¹ and 0.18 h⁻¹, respectively. But at higher (36°C) temperature, *Lb. casei* and *Lc. lactis* showed a great difference in maximum specific growth rate 0.20 h⁻¹ and 0.11 h⁻¹, respectively. Since at 30°C the values of final lactic acid concentration, biomass and lactic acid productivities of *Lb. casei* or *Lc. lactis* are less different than at higher temperatures, the temperature 30°C appears to be optimum for growth and lactic acid production by mixed culture system.

Table 1. The effect of temperatures on the growth of *Lb. casei* or *Lc. lactis* strains grown in date juice. The results are exprimed in biomass and lactic acid production.

Temperature (°C)	30		32		34		36	
Strain	<i>Lb. casei</i>	<i>Lc.lactis</i>	<i>Lb.casei</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb.casei</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lc. lactis</i>
Specific maximal growth rate (h ⁻¹)	0.15	0.18	0.15	0.17	0.19	0.13	0.20	0.11
Biomass (*) (g.l ⁻¹)	2.76	2.11	3.1	1.74	3	1.68	3.2	1.6
Final lactic acid concentration (*) (g.l ⁻¹)	9.4	7.5	10.3	6.3	10.7	5.6	11.8	5.3
Specific maximal lactic acid production rate (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0.23	0.25	0.23	0.25	0.25	0.22	0.26	0.22
Lactic acid productivity, (*) (g.l ⁻¹ h ⁻¹)	0.78	0.63	0.86	0.53	0.89	0.47	0.98	0.44

*The indicated values correspond to 12th hour of fermentation

3.2. Effect of inoculum composition on mixed cultures

In order to study the effect of the initial ratio of the two strains on the lactic acid production, several cultures in Erlenmeyers with different proportions in both strains [5% , 10%, 20%, 30%, 40%, 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis*] using 10% (v/v) inoculum were carried out on date juice (containing 45 g/l of glucose and 40 g/l of fructose) at 30°C. For this different inoculum were performed using cell suspension of *Lb. casei* and *Lc. lactis* in the medium MRS and M17 respectively. The results obtained are shown on Figure 1(a,b). The latter show that the best performances of lactic acid production and lactic acid productivity were obtained when the ratio *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis* is equal to 50%. The results also show that more the ratio between the two strains approaches 1, more the concentration in lactic acid produced and lactic acid productivity are importants. Because of this result, apparently an asymptotic behaviour of the evolution of lactic acid productivity as a function of inoculum ratio, we did not study any further the influence of the *Lc. lactis* / *Lb. casei* ratio. Note however that this should be done. It is clear that temperature is an important parameter of the evolution of the cell suspension as a function of time. The combined effect of the ratio between the initial two cell population and of the temperature has been done.

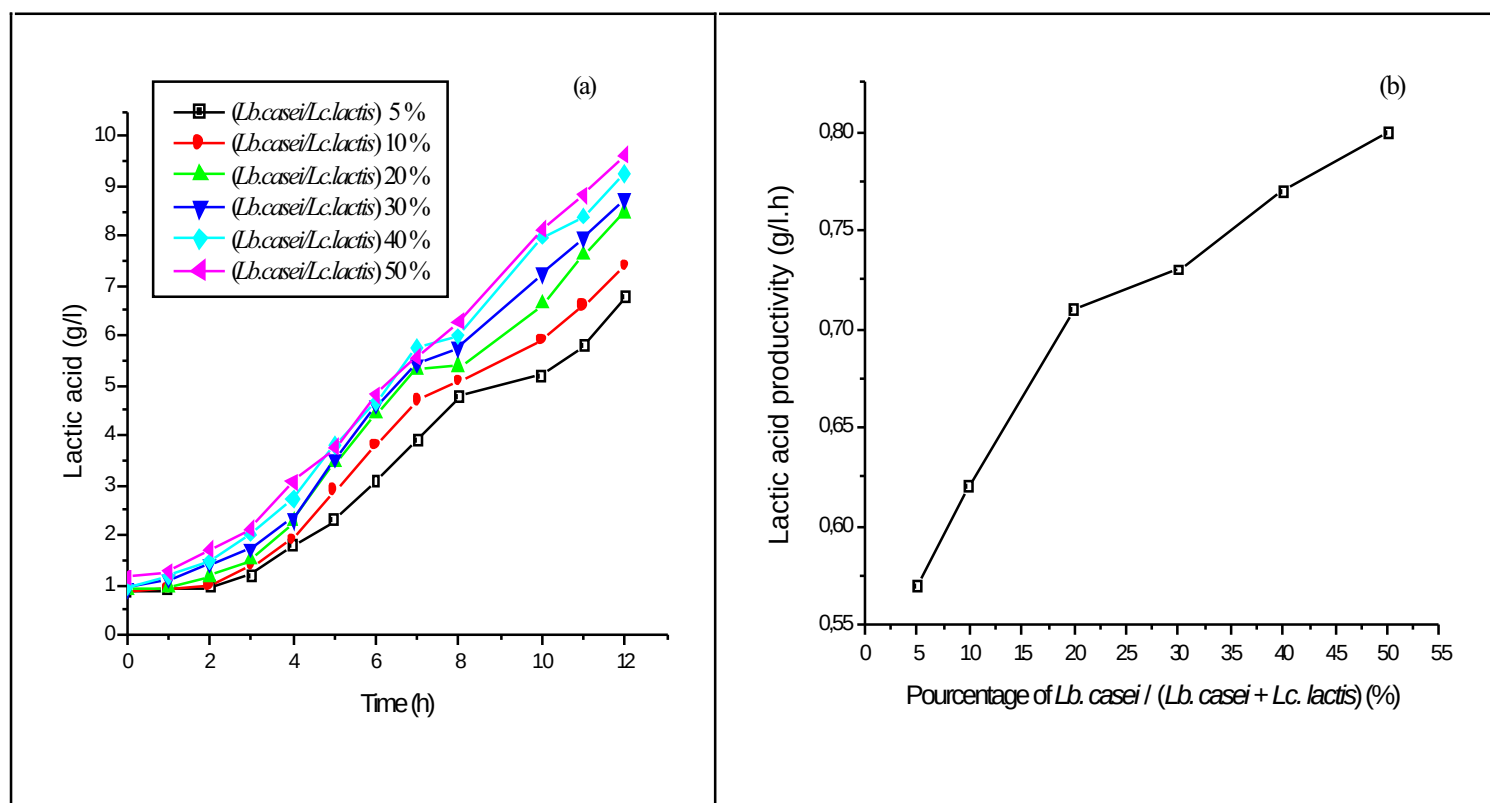


Figure 1(a,b). Lactic acid production (a) and lactic acid productivity (b) from date juice by mixed culture of *Lb. casei* and *Lc. lactis* in batch culture at different inoculum ratio at 30°C.

3.3. Sugars utilization

The utilization of glucose and fructose from date juice by single *Lb. casei* or *Lc. lactis* cells and mixed culture of the above strains were measured in batch cultures. The results are shown in Figures 2 and 3, and Table 2.

According to these results *Lb. casei*, *Lc. lactis*, and the mixed culture differed considerably in their capacity to use fructose and glucose.

As for glucose, as shown in Figure 2, the highest residual concentration of glucose was obtained in fermentation with *Lb. casei* while the lowest concentration was found in fermentation with mixed cultures of *Lb. casei* and *Lc. lactis*. In this case, the total amount of utilized glucose was 82.2, 93.8 and 96% in fermentations by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, and the mixed culture, respectively (Table 2).

As for fructose, as shown in Figure 3, as expected, the concentration of residual fructose decreased during the fermentation coinciding with an increase in lactic acid production. Moreover (or besides) the highest residual concentration of fructose was obtained in fermentation with *Lc. lactis*. This may be due to an increase of lactic acid concentration produced at the same time. In this case, the total amount of fructose

utilized was 94.4, 60.3 and 100% in fermentations by *Lb. casei*, *Lc. lactis*, and the mixed culture, respectively (Table 2). Similar behaviour was observed by Roukas and Kotzekidou (1991), who studied the production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lb. casei* and *Lc. lactis* cells. The lowest concentration was found in fermentation with mixed cultures of *Lb. casei* and *Lc. lactis*.

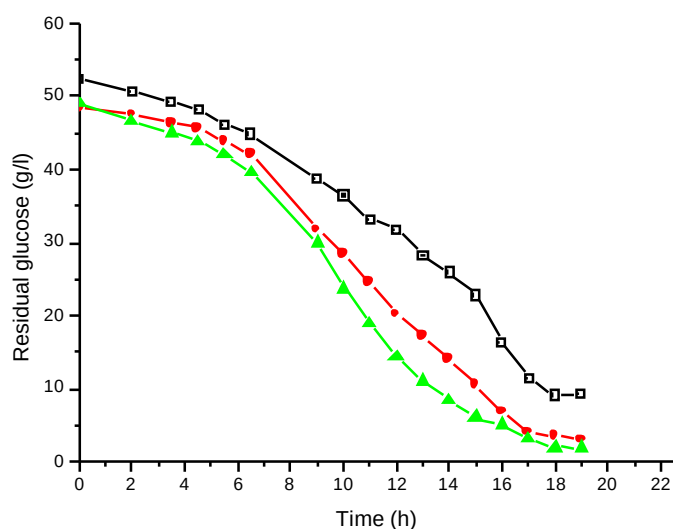


Figure 2. Utilization of glucose from date juice by single *Lb. casei* (■), *Lc. lactis* (●) and mixed culture (▲) at a proportion of 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis* in batch cultures. Temperature 30 °C.

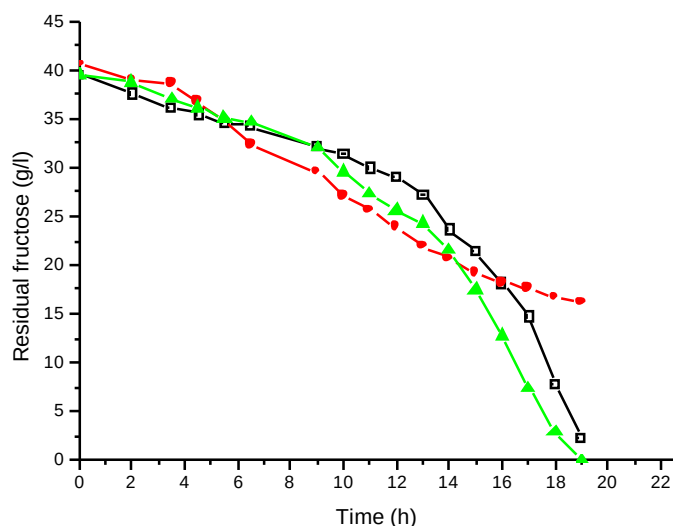


Figure 3. Utilization of fructose from date juice by single *Lb. casei* (■), *Lc. lactis* (●) and mixed culture (▲) at a proportion of 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis* in batch cultures. Temperature 30 °C.

3.4. Lactic acid production

Figure 4 shows a plot of lactic acid concentration as function of fermentation time during batch fermentation of date juice by single *Lb. casei*, *Lc. lactis* and mixed cultures.

As can be seen, the maximum concentration of lactic acid (60.3 g.l^{-1}) was obtained in the mixed culture system, while in the case of single *Lb. casei* and *Lc. lactis* cells, the maximum concentration of lactic acid was 53 g.l^{-1} and 46 g.l^{-1} , respectively (Table 2). Similar results were obtained by Roukas and Kotzekidou (1998), who studied the production of lactic acid from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lb. casei* and *Lc. lactis*. In this case the highest concentration of lactic acid (22.5 g.l^{-1}) was observed in the mixed culture system, while in single culture fermentation of *Lb. casei* or *Lc. lactis*, the maximum concentration of lactic acid was 16 and 10.5 g.l^{-1} , respectively.

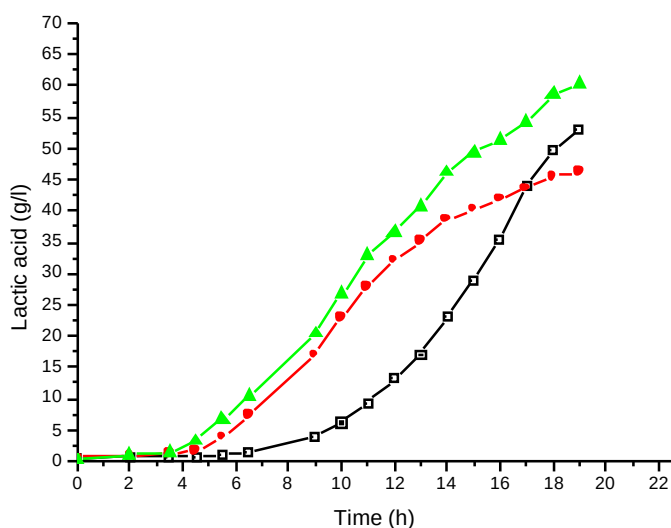


Figure 4. Lactic acid production from date juice by single *Lb. casei* (■), *Lc. lactis* (●) and mixed culture (▲) at a proportion of 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis* in batch cultures. Temperature 30 °C.

3.5. Biomass production

Growth patterns of mixed (1:1) and single batch cultures of *Lb. casei* and *Lc. lactis* are illustrated in Figure 5. The evolutions of both populations are similar and nearly parallele. This is due to the fact that the fermentation temperature is 30°C. Temperature where growths and lactic acid productions of the two strains are similar (Table 1). They followed a pattern similar to lactic acid concentration with maximum viable cell number

observed at the same time as the maximum concentration of lactic acid was observed. The maximum concentration of viable cells in fermentation by *Lb. casei*, *Lc. lactis* and the mixed culture were 10×10^8 , 7.2×10^8 , and 5×10^8 fcu.ml⁻¹, respectively, after 19 h of fermentation. It interesting to note that the final concentration of cells in mixed culture was lower than those of pure culture of about 50% and 25% respectively. This may be due to inhibitory effect of lactic acid.

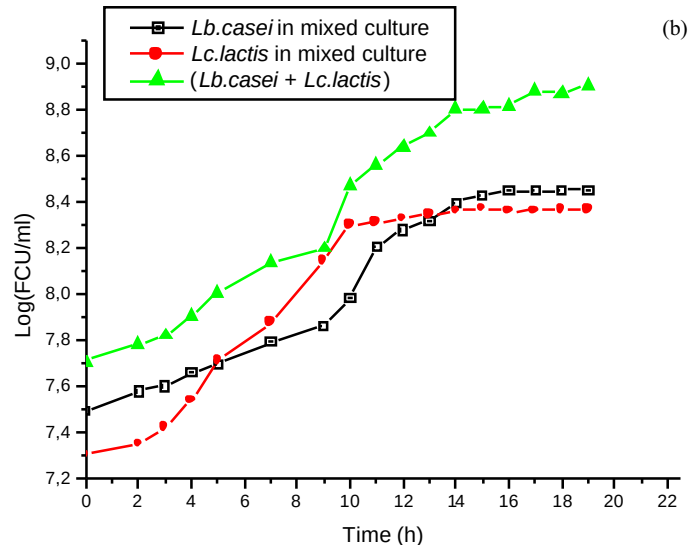
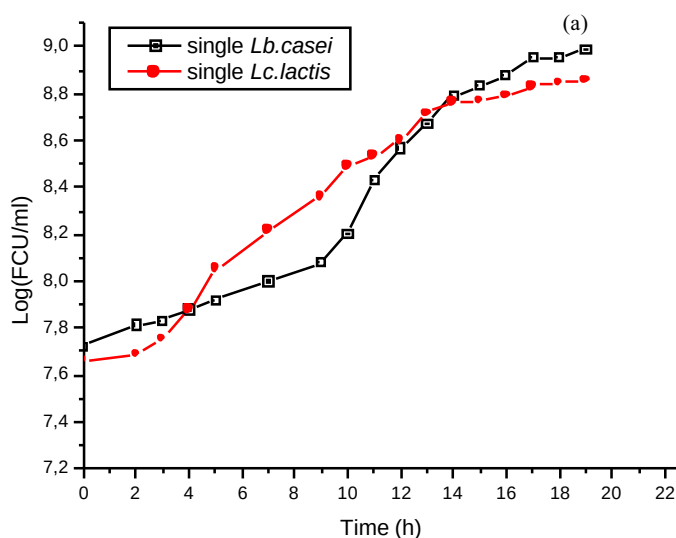


Figure 5 (a,b). Growth of pure cultures (a) of *Lb. casei* and *Lc. lactis* and mixed culture (b) at a proportion of 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis* in date juice in batch cultures. Temperature 30 °C.

From the results described in Figures 3, 4 and 5, the values of various kinetic parameters describing the performance of the two fermentation systems are presented in Table 2.

Differences in lactic acid concentration and lactic acid productivity between single *Lb. casei* and *Lc. lactis* cells and mixed cultures are noted. From these data it can be seen that the lactic acid concentration and productivity, the specific lactic acid production rate and the specific sugar uptake rate were higher in the case of mixed culture compared to those of single culture of *Lb. casei* or *Lc. lactis* cells (Table 2). In fermentations of *Lb. lactis* and *Lc. casei*, and mixed cultures respectively 94.4, 60.3 and 100% of initial fructose, were utilized. In fermentation of *Lb. casei*, *Lc. lactis*, and mixed culture 82.2, 93.8 and 96% of initial glucose, were utilized indicating that apparent synergistic interactions in co-cultures strengthen lactic acid production in comparison of what is observed in single cultures. Based on the above observations,

mixed culture system proved to be a better fermentation system for the production of lactic acid at least from date juice than single culture does.

Table 2. Kinetic parameters of single *Lb. casei* and *Lc. lactis* cells and mixed culture

Kinetic parameters	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Mixed culture*
Maximal lactic acid concentration, P (g l ⁻¹)	53	46	60.3
Maximal lactic acid productivity, δ (g l ⁻¹ h ⁻¹)	2.7	2.4	3.2
Maximal specific lactic acid production rate, q_p (g lactic acid cfu ⁻¹ h ⁻¹)	2.7×10^{-9}	3.3×10^{-9}	6.3×10^{-9}
Maximal specific fructose uptake rate, q_f (g fructose cfu h ⁻¹)	1.9×10^{-9}	1.8×10^{-9}	4×10^{-9}
Maximal specific glucose uptake rate, q_g (g glucose cfu h ⁻¹)	2.6×10^{-9}	3.5×10^{-9}	4×10^{-9}
Percent fructose utilized (%)	94.4	60.3	100
Percent glucose utilized (%)	82.2	93.8	96

(*) The mixed culture is at a proportion of 50% of *Lb. casei* in regard of total cells *Lb. casei* + *Lc. Lactis*.

4. Discussion

Mixed culture systems have been recognized to be effective for several fermentations and many studies have been published. The main are the following:

Lee (2005) compared the fermentative of single and mixed cultures of *Lactobacilli* on batch lactic acid fermentation. Cell growth, glucose utilization, lactic acid synthesis, and free amino acid production were the main parameters studied. In this case the results showed that nitrogen source consumption in mixed culture was lower than that of single culture, the cell density and lactic acid production were better in mixed culture than single culture. Cheirsilp *et al.* (2003) have studied the selection of useful yeast strain and the influence of the selected yeast strain on kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under anaerobic and aerobic conditions. These authors showed that the kefir production in the mixed culture under the anaerobic condition was greater (36 mg.l⁻¹.h⁻¹) than that in the pure culture (24 mg.l⁻¹.h⁻¹). Note that under aerobic condition, a more intensive interaction between these two strains was observed and higher kefir production rate (44 mg.l⁻¹.h⁻¹) was obtained than under anaerobic condition. These results suggested that co-culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* not only reduces the lactic acid concentration by consumption but also stimulates cell growth and kefir production of *Lactobacillus kefiranofaciens* culture.

Garde *et al.* (2002) have used hemicellulose hydrolysate from wheat straw as starting material for production of lactic acid by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus pentosus*. They showed that enzymatic and acidic treated hemicellulose hydrolysates from wheat straw were successfully used as substrate for lactic acid production by a mixed culture of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus pentosus* with a lactic acid yield of 95% slightly higher than these obtained with pure *Lactobacillus pentosus* culture (88%), whereas *Lactobacillus brevis* that was not able to utilize xylulose released from the hemicellulose hydrolysate allows to reach only a yield of 51%.

In their work, Wang *et al.* (2003) have used two strains of lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* in single culture and in combination with either *Bifidobacteria infantis* or *Bifidobacteria longum* for the production of fermented soymilk. Results revealed that *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* were able of metabolizing stachyose and raffinose in soymilk. During the 24-32 h of fermentation with single culture of either *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus thermophilus*, content of raffinose, stachyose, sucrose, and pH in soymilk decreased, while content of fructose and glucose plus galactose increased. Introduction of bifidobacteria with lactic acid bacteria as the starter culture affected significantly the sugar and acid content of the fermented soymilk. A higher reduction in the content of stachyose and raffinose and a lighter content of sucrose, glucose plus galactose and acetic acid were found in soymilk fermented with mixed cultures of bifidobacteria and lactic acid bacteria than that fermented with single cultures of the respective lactic acid bacteria.

Kurosawa *et al.* (1987) have investigated the production of lactic acid starch by the co-immobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis* in Ca-alginate. In that case starch is first hydrolyzed into glucose by amylolytic enzymes of *Aspergillus awamori*, and then glucose is instantly converted to lactic acid by *Streptococcus lactis*, glucose being consumed simultaneously by both microorganisms for their growth.

From the above results it was found that the mixed cultures have highly fermentative capacity relative to single cultures. The use of mixed cultures resulted in improved production of lactic acid, suggesting considerable possibilities for improving lactic acid productivity if applied to industrial media like nutrient-limited conditions, where synergistic associations may be overcome such limitations without sacrificing lactic acid production yields. This has been in fact noted since 1991 by Hesseltine.

Our results showed that the highest concentration of lactic acid (60.3 g.l^{-1}) was obtained in the mixed culture system while in single culture fermentations of *Lb. casei* or *Lc. lactis*, the maximum concentration of lactic acid was 53 g.l^{-1} and 46 g.l^{-1} , respectively. So they go in the same direction for another substrate, date sugar extract, and show the potential that it might for the production of lactic acid with mixed cultures. In conclusion this work shows two important aspects. First, the mixed culture system gave better results regarding lactic acid production and sugar utilization compared to single *Lb. casei* or *Lc. lactis* cells. Second, the date juice extract was an attractive medium for the production of lactic acid by single and mixed culture *Lb. casei* and *Lc. Lactis* cells.

References

- Abou-Zeid, A.A., Abdelrhaman, N., Baghlaf, A.O., 1993. Use of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **57**, (6), 987-988.
- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1991. The formation of oxytetracycline in date-coat medium. Biores. Techn. **37**, 179-184.
- Atkinson, B. and Mavituna, F., 1991. Industrial Microbial Processes. In : Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook (Atkinson, B. and Mavituna, F., Eds.), Macmillan Publishers Ltd, New York, 1181-1183.
- Bautista, E., Dahiya, R.S., Speck, M.L., 1966. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. J Dairy Res., **33**, 299-307.
- Cheirsilp, B., Shimizy, H., Shioya, S., 2003. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol., **100**, 43-53.
- Cheng, P., Muller R.E., Jaeger S., Bajpai R., Iannotti E.L., 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. J. Ind. Microbiol., **7**, 27-34.
- Galesloot, T.E., Hassing, F., Verenga, H.A., 1968. Symbiosis in yogurt: 1. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth Milk Dairy J., **22**, 50-63.
- Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A.S., Ahring, B.K., 2002. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. Biores. Technol., **81**, 217-223.
- Göksungur, Y., Güvenc, U., 1997. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. J. Chem. Technol. Biotechnol. **69** (4), pp. 399-404

- Jalaluddin, A., Abulnaja, K.O., T.A., Abou-Zeid, A.A., 1995. Utilization of Saudi date sugars in production of baker's yeast. *Biores. Technol.* **53**, 63-66.
- Kurosawa, H. Ishikawa, H., and Tanaka, A.L., 1988. Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 183-187.
- Hesseltine, C.W., 1991. Mixed culture fermentations : An introduction on oriental food fermentations. In : *Mixes cultures in Biotechnology* (Zeikus, J.G. and Johuso, E.A., Eds). McGraw-Hill, New York, 1-16.
- Lee, K., 2005. Comparison of fermentative capacities of Lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. *Process Biochemistry*, **40**, 1559-1564.
- Mehaia, M.M., 1991. Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 257-261.
- Moon N.J., Reinbold, G.W., 1976. Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Technol*, **39**, 337-341.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudrant, J., 1997. Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.* **60**, 67-71.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., Boudrant, J., 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Biores. Technol.* **78**, 149-153.
- Nancib, N., Ghoul, M., Larous, L., Nancib., Adimi, Remmal, M. Boudrant, J., 1999. Use of date products in production of the thermophilic dairy strain *Streptococcus thermophilus*. *Biores. Technol.* **67**, 291-295.
- Özen, S. and Özilgen, M., 1992. Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **54**, 57-61.
- Payot, T., Chemaly, Z., Fick, M., 1999. Lactic acid production by *Bacillus coagulans*- Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technol.*, **24**, 191-199.
- Pette, J.W and Lolkema. H., 1950. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lb. bulgaricus* and *Sc. thermophilus*. *Neth Milk. Dairy J*, **4**, 197-208
- Roukas, T., Kotzekidou, P., 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technol.*, **22**, 199-204.
- Roukas, T., Kotzekidou, P., 1991. Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 33-38.

Vick Roy, T.B., 1985. Lactic acid. In : Blanch HW, Drews S, Wang DIC, editors. The Practice of Biotechnology: Commodity Products. Elmsford, NY: Pergamon Press; 761-76.

Wang, Y.C., YU, R.C., Yang, H.Y., Chou, C.C., 2003. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food Microbiol., **20**, 333-338.

3. Effet des sources de carbone pures et mélangées sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

Des travaux antérieurs (Yun et Ryu, 2001) ont montré que la production d'acide lactique réalisée avec un mélange de sucres est meilleure que celle obtenue avec les mêmes sucres pris de façon individuelle.

Comme le jus de datte contient essentiellement du glucose, du fructose et du saccharose nous avons pensé qu'il était utile d'étudier ce phénomène. Pour cela, nous avons étudié la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* en culture discontinue sur sucres pures (glucose, fructose) et mélangés.

Nous avons également étudié l'effet des sucres (glucose et fructose) de jus datte sur la production d'acide lactique et nous avons comparé les performances de production d'acide lactique dans différentes conditions.

- CHAPITRE III -
Cultures discontinues : 3. Lactic acid production from single and mixed sugars
using *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

SOMMAIRE

Abstract	124
1. Introduction	124
2. Materials and methods	125
2.1. Microorganism and growth conditions	125
2.2. Extraction of date juice sugar (glucose/fructose)	126
2.3. Treatment of whey	126
2.4. Analytical methods	127
3. Results and discussion	127
3.1. Lactic acid fermentation with a single carbon source	127
3.2. Lactic acid fermentation with mixed carbon source	128
3.3. Comparative production of lactic acid between whey and date juice	129
3.3.1. Lactic acid production from date juice	129
3.3.2. Lactic acid production from whey	130
4. Conclusion	134
References	134

Lactic acid production from single and mixed sugars using

Lactobacillus casei subsp. *ramnosus*

Aicha Nancib ^a, Nabil Nancib ^a, Joseph Boudrant ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria

^b LSGC-CNRS-ENSAIA, BP, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

Fermentation media composed of single and mixed sugars were used for lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. During fermentation with glucose, fructose, or lactose as a sole carbon source, the volumetric productivities were 0.78, 0.59, and 0.62 g.l⁻¹.h⁻¹ with final lactic acid concentrations of 18.85, 14.24 and 14.98 g.l⁻¹, respectively. For lactic acid fermentations performed with glucose/fructose or date juice sugars (glucose/fructose) mixtures as carbon sources, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* grown on such a mixture of sugars (glucose, fructose) simultaneously consumed these sugars. If lactic acid yield, volumetric productivity and lactic acid concentration were higher when grown on mixed sugars, the best kinetic parameters were obtained with date juice sugars. Besides batch fermentations were performed to compare the effects of whey and date juice on the production of lactic acid. The results indicated that fermentation using date juice was significantly affected by a decreasing of substrate utilization. Indeed, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* cannot utilize sucrose, that accumulates in the medium.

Keywords : *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*; lactic acid; mixed sugars; date juice sugars.

1. Introduction

Lactic acid has various applications in food, pharmaceutical, leather, and textile industries (Vick Roy, 1985). Since lactic acid has high reactivity due to containing both hydroxyl (-OH) and carboxyl (-COOH) groups, it plays a major role as a chemical feedstock capable of being converted to various chemicals such as acrylic acid, propylene glycol, acetaldehyde, and 2,3-pentanedione (Varadarajan and Miller, 1999). The continuous increase in demand for lactic acid has been due to its increasing

applications in preparation of biodegradable polymers, medical sutures, and green solvents (Datta *et al.*, 1995; Litchfield, 1996). Lactic acid is industrially produced either by chemical synthesis or by microbial fermentation. A biological method has the advantage that an optically pure lactic acid can be obtained by choosing a strain of lactic acid bacteria, whereas chemical synthesis always results in a racemic mixture of lactic acid (Ryu *et al.*, 2003). The presence of L(+)-lactic acid with high optical purity gives polylactic acids of high melting point and high crystallinity (Lunt, 1998; Yun and Ryu, 2001). The carbon source for microbial production of lactic acid can be either sugar in pure form such glucose, sucrose, lactose etc. or sugar-containing materials such as molasses, whey, sugarcane bagasse, cassava bagasse, and starchy materials from potato, tapioca, wheat, barley, and carrot (Rojan *et al.*, 2007). For this purpose, different vegetable materials are able to be used; the sole condition being that the raw materials are rich in single sugar or polymer which is easy to hydrolyze.

Algeria produces more than 400 different varieties of dates with an annual production of over 300.000 tons. However, about 20% of the production is lost due to over-ripening and improper handling, processing, and marketing. Utilization of poor-quality dates and date by-products has been studied for bakery and ice-cream (Hamad *et al.*, 1983), for the production of caramel color, alcohol, vinegar, citric acid, oxytetracycline (Mikki *et al.*, 1983; Mehaia and Cheryan, 1991; Roukas and Kotzekidou, 1997; Abou-Zeid *et al.*, 1993), as well as for thermophilic dairy starter, lactic acid production and single-cell protein preparation (Kamel, 1979; Khan *et al.*, 1995; Nancib *et al.*, 1997; Nancib *et al.*, 1999; Nancib *et al.*, 2005). The value of date juice lies in their content of materials such as sugars (glucose and fructose), amino acids and minerals (Abou-Zeid *et al.*, 1991), thus making date extracts quite suitable as feedstock for fermentation.

The aim of this work was to investigate the consumption of different sugars by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* under two different conditions: when they are in pure solution and when they are mixed. We also studied the effect of date juice sugars (glucose and fructose) on lactic acid production. This provides some informations about the behaviour of date juice fermentation for lactic acid production.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and growth conditions

Lactobacillus casei subsp. *ramnosus* NRRL-B445, a homofermentative lactic acid producer, was used. Stock cultures were stored in MRS medium with 25% (v/v)

glycerol at -20°C . The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture to Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid MRS medium for preculture. The flask was subsequently incubated at 38°C for 12 h, the time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase. Then, the culture was inoculated to Erlenmeyer flasks containing the production medium. A 10% inoculum grown in the MRS medium was used in all fermentation. Flask experiments were carried out in 250-ml Erlenmeyer containing 100 ml of production medium. Batch fermentations were performed in a 2l stirred tank fermentor (Biolaphite) with a working volume of 1l. The agitation speed and culture temperature were controlled at 150 rpm and 38°C respectively. The production medium consisted of yeast extract, 10 g.l^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g.l^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g.l^{-1} ; KH_2PO_4 , 3 g.l^{-1} ; K_2HPO_4 , 3 g.l^{-1} ; sodium acetate, 2 g.l^{-1} ; Tween 80, 1 ml/l. The different sugars tested in pure solution were glucose, fructose and lactose at a concentration of 100 g.l^{-1} . The two different sugars constituting the date juice (glucose and fructose) were tested in mixed solutions (each at 50 g.l^{-1}).

2.2. Extraction of date juice sugar (glucose/fructose)

The method used was adapted from Nancib *et al.* (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting. Tap water added at ratio of two parts to one part of dates (by weight). The mixture was heated at 80°C for 2 h with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min to separate the cellulosic debris, while the supernatant was essentially as the carbon source in the fermentation medium. The sugar content of the collected supernatant solution was determined. Immediately prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice diluted to the desired concentration of sugar.

2.3. Treatment of whey

Sweet whey from cheese manufacture was obtained from the Lactofrance (Baleycourt, France). Protein precipitation was induced by autoclaving the whey at 121°C for 15 min. Precipitated proteins were removed by centrifugation at 20,000g for 15 min. The supernatant was stored frozen (Schepers *et al.*, 2000). The pH of the solution was adjusted to 6 with ammonia solution (5N) and the medium sterilized at 121°C for 20 min. After cooling, the concentrated whey contained 150 g.l^{-1} total sugars was supplemented with yeast extract, 10 g.l^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g.l^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g.l^{-1} ; KH_2PO_4 , 3 g.l^{-1} ; K_2HPO_4 , 3 g.l^{-1} ; sodium acetate, 2 g.l^{-1} ; Tween 80, 1 ml/l.

2.4. Analytical methods

Biomass concentration was estimated by optical measurement at 620 nm and calibrated to the cell dry weight. Concentrations of lactic acid, glucose, fructose, sucrose and lactose were determined by a high-performance liquid chromatography equipped with an RI, UV detector (Waters, USA). The column used was a Polypore H (250 x 7 mm) (Bronnlee labs, USA) operated at 65°C using 0.04N H₂SO₄ as eluant at a flow rate of 0.9 ml/min. Total sugar was determined according to the volumetric method of Lane-Eynon (1923).

3. Results and discussion

The utilization of sugars by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* has been investigated under different conditions either as single or mixed carbon source.

3.1. Lactic acid fermentation with a single carbon source (glucose, fructose and lactose)

First glucose, fructose and lactose were tested in pure solutions. In all cases, the initial sugar content was 100 g.l⁻¹. The kinetics of cell growth and lactic acid formation by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* during the Erlenmeyer cultivation with media containing glucose, fructose, or lactose as a carbon source are shown in Fig.1(A,B,C). The experiments revealed that *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* favorably utilized glucose, fructose and lactose, as carbon sources for growth and lactic acid production. Moreover, when *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* was cultivated separately on these three carbon sources, cell growth and lactic acid formation patterns were similar. However, the highest volumetric productivity was found to be with cells grown in a medium containing glucose (Fig. 1A, Table 1). The volumetric productivity, yield of lactic acid and final lactic acid concentration were 0.78 g.l⁻¹.h⁻¹, 0.38 g-lactic acid/g-glucose and 18.85 g.l⁻¹ respectively. It also noted that the rate of glucose consumption was higher than on fructose or lactose. This is probably due to the fact that the uptake of each sugar is dependent upon sugar transport capacities (Dominguez *et al.*, 1997). As shown in Fig. 1(B,C) and (Table 1), fructose and lactose appears have a similar course and were also reasonable carbon sources. The volumetric productivity, yield of lactic acid and final lactic acid concentration were 0.59 g.l⁻¹.h⁻¹, 0.3 g.g⁻¹ and 14.24 g.l⁻¹ with fructose and 0.62 g.l⁻¹.h⁻¹, 0.29 g.g⁻¹ and 14.98 g.l⁻¹ with lactose, respectively.

Table 1. Kinetics parameters during growth of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in batch cultures on glucose, fructose, lactose, glucose + fructose mixture and date juice sugars. These assays were performed in Erlenmeyer flasks.

Parameter	Growth substrate				
	Glucose 100 g.l ⁻¹	Fructose 100 g.l ⁻¹	Lactose 100 g.l ⁻¹	Glu+Fru 50+50 g.l ⁻¹	Date sugars Glu 46 g.l ⁻¹ + Fru 51 g.l ⁻¹
Substrate use (%)	43.38	41	45.56	27.3 / 24.3	31 / 32.5
Volumetric productivity (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	0.78	0.59	0.62	0.89	1
Lactic acid yield (g.g ⁻¹)	0.38	0.3	0.29	0.75	0.94
Lactic acid produced (g.l ⁻¹)	18.85	14.24	14.98	20.97	23.75
q_{maxGlu} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	1.27	-	-	0.63	0.66
q_{maxFru} (g l ⁻¹ h ⁻¹)	-	0.93	-	0.41	0.50
$q_{maxLact}$ (g l ⁻¹ h ⁻¹)	-	-	1.07	-	-

3.2. Lactic acid fermentation with mixed carbon source (glucose/fructose and date juice sugars)

Following the analysis of the sugar consumption on pure sugar media it was necessary to study the behaviour of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* during the fermentation of a medium containing glucose and fructose in a way it simulates the composition of date juice. For the lactic acid fermentations with glucose/fructose mixture as carbon sources *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, these sugars simultaneously consumed, with the best substrate use [51.6 (= 27.3 + 24.3) and 63.5% (= 31 + 32, 5) Table 1]. The lactic acid concentration and volumetric productivity were higher than growth on each sugar alone (Table 1). This is in agreement with the observation of Yun and Ryu (2001). These authors have shown that when *Enterococcus faecalis* RKY1 was grown on a mixture of glucose and fructose, these sugars are simultaneously consumed, and the volumetric productivity is higher than when grown on the individual sugars.

Moreover, glucose is metabolized more rapidly. It should also be noted that the overall rate of glucose consumption was 32% higher than that obtained on fructose (0.66 g.l⁻¹.h⁻¹ and 0.50 g.l⁻¹.h⁻¹, Table 1) in date juice solution (glucose/fructose) and 53.65% in glucose and fructose mixture solution (0.63 g.l⁻¹.h⁻¹ and 0.41 g.l⁻¹.h⁻¹, Table 1), which may be ascribed to the difference in the phosphotransferase system transport capacities

of these two sugars in *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. This implies that the manner in which sugar mixture is metabolized varies significantly from that of each sugar alone. In fact the uptake rate of each sugar from a mixture of glucose and fructose is always dependent upon sugar transport capacities (Yun and Ryu, 2001). Ellwood *et al.* (1979) have also shown that for *Streptococcus mutans* the preferred substrate was glucose and the glycolytic rate for fructose was half that of glucose.

In our assays when *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* was grown on mixtures of glucose and fructose of date juice, co-consumption was also observed as shown in Fig. 2(B). However, the highest volumetric productivity was then obtained. The volumetric productivity and final lactic acid concentration were $1 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ and 23.75 g.l^{-1} respectively (Table 1). Date juice sugar extract not only contained sugars, but also contains other nitrogen sources mainly amino acids, vitamins and minerals (Abou-Zeid *et al.*, 1991). The presence of these compounds in the date juice probably has stimulatory effects on the growth of *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* and lactic acid production.

3.3. Comparative production of lactic acid between deproteinized whey and date juice

The purpose of these experiments was to compare lactic acid production using date juice and deproteinized whey as raw materials.

3.3.1. Lactic acid production from date juice

In order to investigate the influence of date juice sugars on lactic acid fermentation, *Lactobacillus casei* was cultivated in fermentor using date juice medium with an initial sugar concentration of 145 g.l^{-1} (glucose 35 g.l^{-1} and fructose 30 g.l^{-1} , sucrose 80 g.l^{-1}). As shown in Figure 3A, the glucose and fructose are consumed simultaneously and after 10 h completely. The concentration, yield and productivity of the produced lactic acid (calculated at the end of fermentation, 10 hours) are 54.17 g.l^{-1} , 78% and $2.16 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectively. On this figure it is observed that sucrose is not at all utilized, which arises when only sucrose is present in fermentation medium (data not shown). If the absence of utilization of sucrose in the presence of glucose and fructose may be due to catabolite repression, the persistence of this behaviour once they are exhausted is due to another phenomenon. Apparently a momentaneous presence of these sugars would block irreversibly the utilization of the sucrose. The first behavior, catabolite repression, noted with sucrose, not consumed when glucose and fructose are present, is similar to

this of *Enterococcus faecalis* observed by Yun and Ryu (2001). In fact these authors showed that both glucose and fructose induced carbon catabolite repression on maltose metabolism when *Enterococcus faecalis* was grown on a mixture of fructose and maltose or glucose and maltose. In the same way, Stülke and Hillen (1999) have shown that if provided with a mixture of nutrients, bacteria are able to preferentially utilize the one that allows fastest growth.

Concerning the present results (Figure 3 A and Table 1), it is observed that the glucose level is lower than the fructose level, indicating the faster utilization of glucose. Similar results have been reported by Aksu and Kutsal (1986). They demonstrated that *Lactobacillus casei* assimilates and converts glucose to lactic acid more rapidly than the other substrates. In that sense, but for a yeast species, *Saccharomyces cerevisiae*, Busturia and Lagunas (1986) showed that the glucose transport by facilitated diffusion used two different carriers, one of high affinity, the other of low affinity. In this system glucose has a higher affinity implying its more rapid transport. Rather similarly Phowchinda and Strehaiano (1999) observed that *Saccharomyces cerevisiae* grown in juice of sweet sorghum containing glucose, fructose and sucrose utilizes glucose always before fructose.

So in conclusion, if the observation of sugar utilization in presence of sucrose is rather well explained, the reason of the non utilization of glucose and fructose once sucrose is exhausted remains to deepen.

3.3.2. Lactic acid production from whey

The production of lactic acid from concentrated whey (150 g.l⁻¹ initial total sugar) by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* in batch culture is shown in Fig. 3(B). The concentrations of biomass and lactic acid increase with time to reach at 40 hours final concentrations of lactic acid of 110.34 g.l⁻¹. Yield and volumetric productivity of lactic acid are respectively equal to 76% and 2.2 g.l⁻¹.h⁻¹. On date juice, the values obtained in fermentor for the yield and volumetric productivity are respectively of 78% and 2.16 g.l⁻¹.h⁻¹ (see top paragraph 3.3.1, the values indicated in Table 1 are for flask experiments). These results are either higher or lower than those noted for date juice.

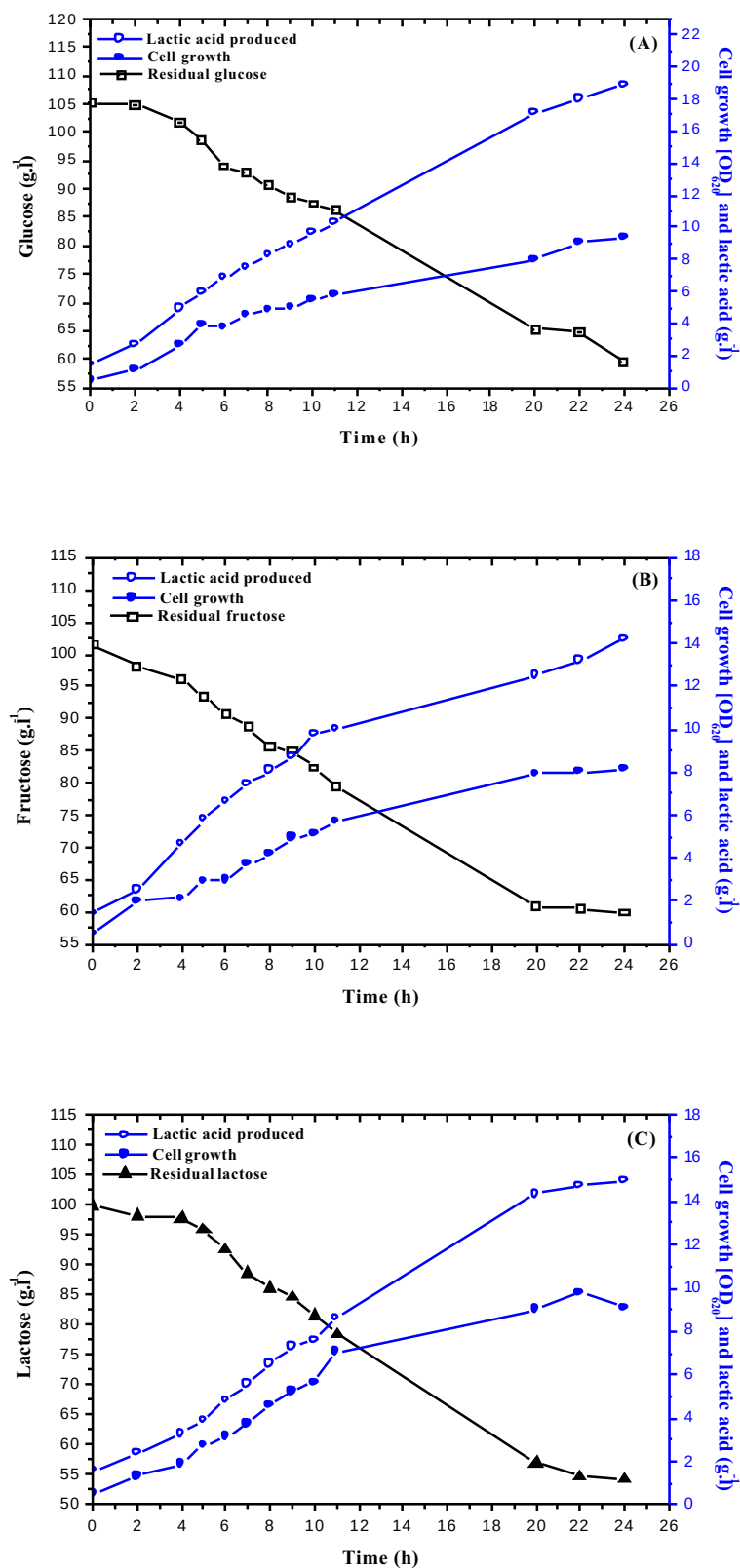


Fig. 1(A, B, C). Profiles of cell growth, sugar consumption, and lactic acid formation with glucose, fructose and lactose as carbon sources during batch cultivation of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. (A), glucose 105 g.l⁻¹; (B), fructose 103 g.l⁻¹; (C), lactose 100 g.l⁻¹. Assays performed in Erlenmeyer flasks.

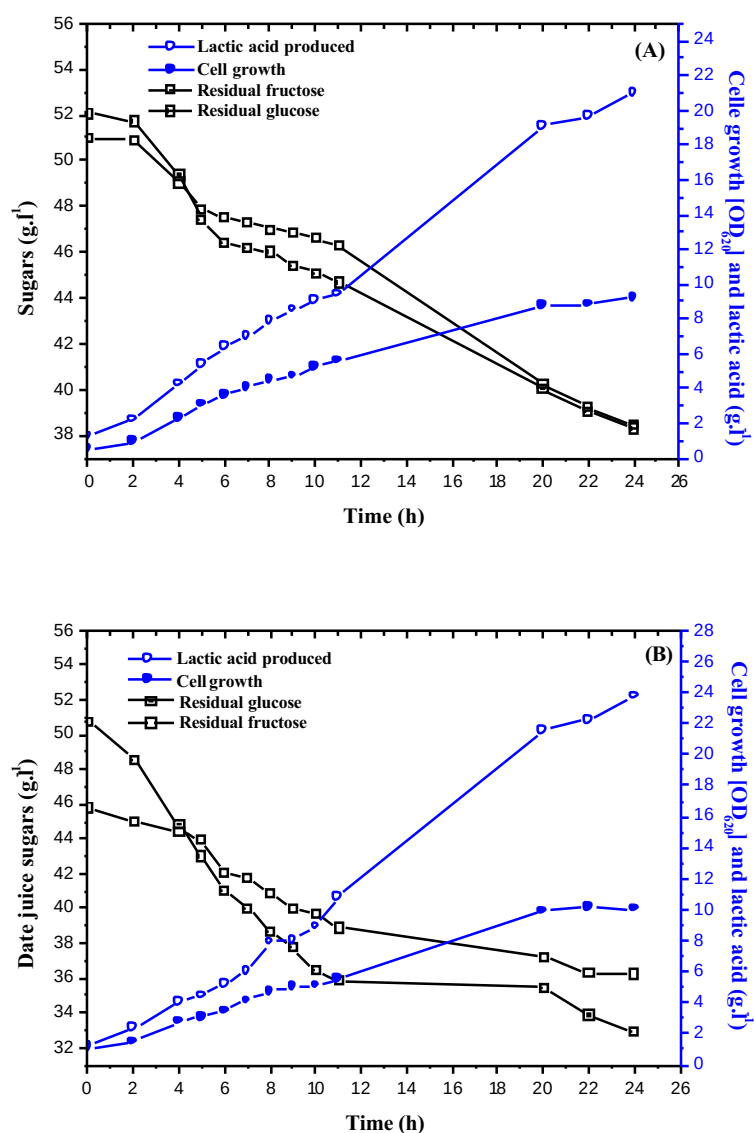


Fig. 2(A, B). Profiles of cell growth, sugar consumption, and lactic acid formation with glucose/fructose and date juice containing (glucose/fructose) as mixed carbon sources during batch cultivation of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. (A) fructose 51 g.l⁻¹+ glucose 52 g.l⁻¹; (B) Date juice sugars : fructose 46 g.l⁻¹ + glucose 51 g.l⁻¹. Assays performed in Erlenmeyer flasks.

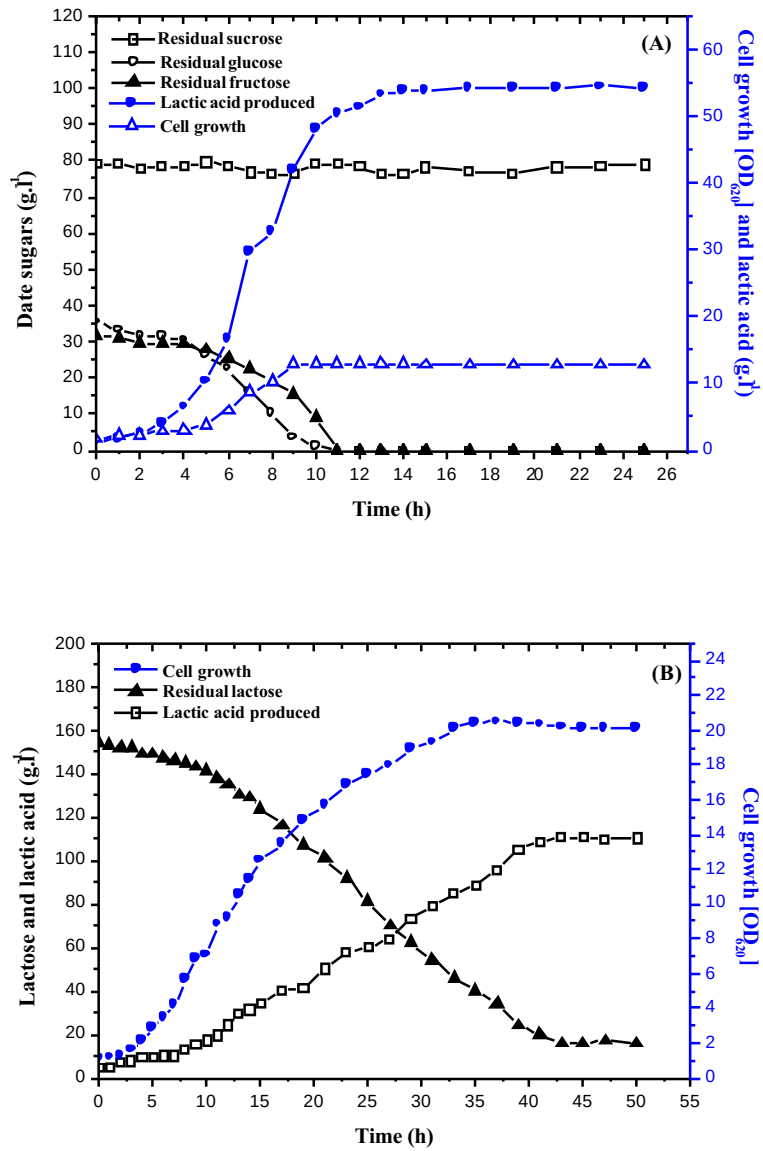


Fig. 3(A, B). Profiles of cell growth, sugar consumption, and lactic acid formation with date juice (A) and whey deproteinized (B) during batch cultivation of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Assays performed in fermentor.

4. Conclusion

The behaviour of the *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* on mixed sugars is different from this on single sugars. With glucose, fructose, and lactose as single carbon source, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* efficiently metabolized these sugars into lactic acid (with decreasing rates). With mixed carbon sources (glucose and fructose), *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* grows simultaneously metabolized the corresponding sugars. The lactic acid concentration, volumetric productivity and yield lactic acid are then higher than when on a single sugar alone. The best kinetic parameters were obtained with date juice (mainly glucose and fructose as carbon source, sucrose being not used). Both date juice and whey were found as satisfying substrates for lactic acid production.

Sucrose is not used, but could probably be after hydrolysis. This will be studied further later. The date juice sugar is an attractive medium for the production of lactic acid by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* and could be used for industrial purposes.

Acknowledgements

This work was supported by the accord-programme N° COMDU 502 of Comité Mixte d’Evaluation et de Prospective (CMEP) between France and Algeria.

References

- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1993. Utilization of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. J. Chem. Tech. Biotechnol. **58**, 77-79.
- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1991. The formation of oxytetracycline in date-coat medium. Biores. Technol. **37**, 179-184.
- Aksu, Z., Kutsal, T. 1986. Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together. Biotechnol. Lett. **8**, 157-160.
- Busturia, A. and Lagunas, R. 1986. In the yeasts chap 2, Vol 3, 2nd ed., Rose, A.H. and Harisson, J.S. ED., Academic press.
- Datta, R., Tsai, S.P, Bonsignore, P., Moon, S.H., Franck, J.R., 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol Rev. **16**, 221-231.

Dominguez, H., Coccagn-Bousquet, M., Lindley, N.D., 1997. Simultaneous consumption of glucose and fructose from sugar mixtures during batch growth of *Corynebacterium glutamicum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47**, 600-603.

Ellwood, D.C., Phipps, P.J., Hamilton, I.R., 1979. Effect of growth rate and glucose concentration on the activity of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* ingbritt grown in continuous culture. Infect and Immunit, 224-231.

Hamad, A., Mustafa, A.I., Al-Kahtani, M.S., 1983. Possibility of utilizing dates syrup as sweetening and flavouring agent in ice cream making. In: Proceeding of the First Symposium on Date Palm in Saudi Arabia, King Faisal University, Al-Hassan, pp. 544-549.

Kamel, B.S., 1979. Dates as a potential substrate for single cell protein production. Enzyme. Microb. Technol. **1**, 180-182.

Khan, J.A., Abulnaja, K.O., Kumosani, T.A., Abou-Zeid, A.A., 1995. Utilization of Saudi Dates sugars in production of baker's yeast. Biores. Technol. **13**, 257-261.

Lane, J.H., Eynon, L., 1923. Determination of reducing sugars by means of fehling's solution with methylene blue as internal indicator. J. Soc. Chem. Ind. Trans. **42**, 32-36.

Litchfield, J.H., 1996. Microbial production of lactic acid. Adv. Appl. Microbiol. **42**, 45-95.

Lunt, J., 1998. large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polym. Degrade. Stabil. **59**, 145-152.

Mehaia, M.A., Cheryan, M., 1991. Fermentation of date extract to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. Enzyme. Microbio. Technol. **13**, 257-261.

Mikki, M.S., Bukhaev, V., Zaki, F.S., 1983. Production of caramel colour from date juice. In: Proceeding of the First Symposium on the Date Palm in Saudi Arabia, King Faisal University, Al-Hassan, pp. 552-558.

Nancib, N., Ghoul, M., Larous, L., Nancib, A., Adimi, L., Remmal, M., Boudrant, J., 1999. Use of date products in production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*. Biores. Technol. **67**, 291-295.

Nancib, N., Nancib, A., Boudrant, J., 1997. Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. Biores. Technol. **60**, 67-71.

Nancib, N., Nancib, A., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., Boudrant, J., 2005. joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. Bores. Technol. **96**, 63-67.

Phowchinda, O., Strehaiano, P., 1999. Utilization of mixed sugars for alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Thammasat. Int. J. Sc. Tech., **4**, 23-31.

Rojan, P.J., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A., 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass : an overview on process developments and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 524-534.

Roukas, T., Kotzeidou, P., 1997. Pretreatment of date syrup to increase citric acid production. *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 273-276.

Ryu, H.W., Yun, J.S., Wee, Y.J., 2003. Lactic acid in: pandey, A. (Ed), concise Encyclopedia of bioresource Technology. The Haworth press, new York, p635.

Schepers AW, Thibault J, Lacroix C., 2000. Comparison of neural networks and non linear regression models for *Lactobacillus helveticus* growth in pH-controlled batch cultures. *Enzyme. Microb. Technol.* **26**, 431-445.

Stülk, J., Hillen, W., 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 195-201.

Yun, J-S and Ryu, H-W, 2001. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Process Biochemistry*, **37**, 235-240.

Varadrajan, S., Miller, D.J., 1999. Catalytic upgrading of fermentation- derived organic acids. *Biotechnol. Prog.* **15**, 845-854.

Vick Roy, T.B., 1985. Lactic acid. In: Moo Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*, Pergamon Press. **3**, 761-775.

CHAPITRE IV

Cultures semi-continues

Etudes des cinétiques et des performances en culture semi-continue

Le mode de fermentation semi-continue est un mode de culture peu ou pas rencontrée pour la production d'acide lactique (Ding et Tan, 2006; Bai *et al.*, 2003; Roukas et Kotzekidou, 1998). En effet les seuls résultats actuellement publiés ont été obtenus en mode discontinu et continu. Cependant le mode semi-continu, même s'il est plus compliqué, présente bien des avantages par rapport au mode de la culture discontinue classique : Il permet une maîtrise de l'apport de la source de carbone apportée. Il en résulte donc un meilleur contrôle de certains phénomènes de stress dont peuvent être l'objet les microorganismes en cours de fermentation notamment lorsqu'ils sont mis brutalement en présence de fortes concentrations de sucres ou substrats.

L'objectif principal de ce travail s'inscrit dans ce cadre et a consisté à mettre au point un procédé de fermentation en culture semi-continue sur jus de datte en proposant une stratégie simple permettant d'obtenir une productivité maximale et un meilleur rendement.

Pour cela, nous avons étudié les effets engendrés par le débit et la concentration du milieu d'alimentation sur la croissance bactérienne, la consommation de sucre de jus de datte et la production d'acide lactique.

Puis une synthèse des résultats obtenus a été faite. Elle a permis le choix de la concentration du milieu d'alimentation et du débit optimal.

- CHAPITRE IV -
Cultures semi-continues: Optimisation of glucose date juice for the production of lactic acid by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* in fed batch culture

SOMMAIRE

Abstract	140
1. Introduction	140
2. Materials and methods	142
2.1. Microorganism	142
2.2. Date juice extract	142
2.3. Inoculum preparation	142
2.4. Production medium	143
2.5. Fed batch cultivation studies	143
2.6. Analytic methods	143
2.7. Productivity and yield	143
3. Results	144
3.1. Effect of feeding rate	144
3.2. Influence of the complementation of the feeding medium	144
3.3. Influence of the concentration of the feeding medium	146
3.4. Fed batch assays at lower feeding rates	148
4. Discussion	149
5. Conclusion	150
References	151

Optimisation of glucose date juice feeding for the production of lactic acid by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in fed-batch culture

Aicha Nancib ^a, Nabil Nancib ^a, Joseph Boudrant ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria

^b LSGC-CNRS-ENSAIA, BP, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

The aim of this work is to determine the effects of the feed rate value of the main carbon source (glucose) on the cell growth, the consumption of glucose and lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in fed batch cultures. For this, several feed rates and concentrations of the feeding medium were used and the effect was measured. For this three feed rates (33, 75 and 150 ml.h⁻¹) were tested in combination with two glucose concentrations (62 and 100 g.l⁻¹ of date juice glucose) of the feeding medium. The highest volumetric productivity (1.3 g.l⁻¹.h⁻¹) and lactic acid yield (1.7 g.g⁻¹) were obtained at a feeding rate of 33 ml.h⁻¹ and for a concentration of 62 g.l⁻¹ of date juice glucose in the feeding medium. Most of the glucose of date juice was then completely utilized (residual glucose less than 1 g.l⁻¹) and after 70 hours of fermentation a lactic acid concentration of 89.2 g.l⁻¹, which was the highest, was obtained.

Keywords: Fed-batch culture; lactic acid; *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*; date juice glucose

1. Introduction

Lactic acid has a long history of usage in the food industry as a preservative and acidulant chemical. Now it has wide applications in the fields of food, pharmaceutical, medical, and chemical industries (Davison *et al.*, 1995; Litchfield, 1996; Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). Lactic acid is generally considered as a fundamental chemical, due to its high reactivity that stems from having both carboxyl and hydroxyl groups, by which lactic acid can be converted into several potential chemicals, such as propylene glycol, acetaldehyde, acrylic acid, 2,3-pentanedione, propanoic acid, and polylactic acid (PLA) (Varadarajan and Miller, 1999; Datta *et al.*, 1995). Recently, the demand for lactic acid has been increasing considerably, due to its new applications as

the monomer of PLA that can be used for the production of biodegradable and compostable plastics (Datta *et al.*, 1995; Vink *et al.*, 2003).

The efficiency and economics of the ultimate lactic acid fermentation is still a problem from many points of view and media composition plays a vital role in the improvement of the corresponding process. Nowadays, research effort is focused on looking for new and effective nutritional sources and new progressive fermentation techniques enabling the achievement of both high substrate conversion and high productivity.

Lactic acid production has been studied with various media components (Monteagudo *et al.*, 1994). As mentioned earlier, the date is a carbohydrate source which is suitable for lactic acid productions using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (Nancib *et al.*, 2005; Nancib *et al.*, 2001). Thus, date-products could be considered as suitable agricultural materials for the production of different compounds. The value of date products lies in their content of materials such sugars, amino acids and minerals (Abou-Zeid *et al.*, 1991).

Generally speaking, the fed-batch fermentation processes is the most convenient alternative for the production of metabolites by fermentation. This type of approach has been used successfully for many types of fermentation (Dermici *et al.* 1999), antibiotic (Colombie *et al.*, 2005), bacteriocin production (Pongtharangkul and Dermici, 2006, Leroy and de Vuyst, 2001), and recombinant proteins (Choi and Park, 2006). It is also currently used for industrial amino acid production by fermentation. In fact this kind of process allows the substrate to be added into the reactor intermittently or continuously as needed in order to reach the best performances (productivity and yield). However academic or research information concerning the fed periods of fed-batch cultures, but control aspects, remains rather scarce. This is generally true for most fermentations including lactic acid fermentation. As for the other fermentations, a few works concerning the behaviour of *Escherichia coli* during fed-batch periods: one with one normal strain (Lee *et al.*, 1997), and one with a recombinant strain (Gschaedler *et al.*, 1994) and the review of Lee *et al.* (1999) but which is about the application of methodology based on fuzzy control and neural network. Most of the other studies have been carried out with lactic strains and four can be cited (Ding and Tan, 2006, Bai *et al.*, 2003; Roukas and Kotzekidou, 1998; Chen and Lee, 1997). But even with this, the studies of fed-batch cultures are scarce. To summarize, the main contents of these works are the following: Ding and Tan (2006) using an exponential substrate feeding tried to avoid over and underfeedings. Bai *et al.* (2003) developed a process to optimize the

production of ammonium lactate, and Roukas and Kotzekidou (1998) worked on whey with repeated fed-batch by mixed cultures.

In the present work, the effects of the combination of both the glucose concentration and the inlet flow rate of the feeding solution into the fermentor during the fed phase were studied for maximum lactic acid volumetric productivity and concentration, and low residual glucose concentration.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Lactobacillus casei subsp. *rhannosus* NRRL-B445, a homofermentative lactic acid producer, was used. Stock cultures (1 ml) were stored at – 20°C in *Lactobacilli* MRS medium with 25% (v/v) glycerol.

2.2. Date juice extract

The method used was adapted from Nancib *et al.* (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting and tap water added at a ratio of two parts of water to one part of dates (V/W). The mixture was heated at 80°C for 2h with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min. to separate the cellulosic debris. The supernatant was recovered and used essentially as the carbon source in the fermentation medium. Immediately and prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice was diluted to the desired concentration of glucose. While the supernatant was essentially as the carbon source in the fermentation medium. The glucose content of the collected supernatant was determined.

2.3. Inoculum preparation

The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture (1 ml) to an Erlenmeyer flask containing 100 ml of liquid MRS medium for preculture. The flask was subsequently incubated at 38°C for 12 h, the time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase. Then, the culture in the fermentor containing the production medium was inoculated. A 10% inoculum grown in the MRS medium was used in all fermentations.

2.4. Production medium

The medium for the cultures had the following composition: date juice glucose 45 g l⁻¹; yeast extract, 10 g.l⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g.l⁻¹; MnSO₄.H₂O, 0.03 g.l⁻¹; KH₂PO₄, 3 g.l⁻¹; K₂HPO₄, 3 g.l⁻¹; CH₃COONa .3H₂O, 2 g. l⁻¹ and Tween 80, 1ml.l⁻¹.

2.5. Fed batch cultivation studies

Fed batch cultivation was carried out in a 10l stirred tank fermentor (LKB) and the initial working volume was set at 1l. The pH value of the culture was automatically maintained at 6.0 by the addition of 5N NH₄OH solution, while the temperature was maintained at 38°C and the agitation speed at 150 rpm. After inoculation, batch fermentation was carried out for 24 h. Then, the fed-batch started with supply of feed medium. The feeding medium containing date juice glucose (62 or 100 g.l⁻¹) was continuously added into the fermentor with a peristaltic pump at different feeding rate (150, 75, 33, 22 and 18 ml.h⁻¹).

2.6. Analytic methods

Cell concentration was estimated by measurement of optical density at 620 nm correlated to dry cell weights. Glucose and lactic acid concentrations were determined by high performance liquid chromatography equipped with an RI, UV detector (Waters,USA). The column used was a Polypore H (250 x 7 mm) (Brownlee labs, USA) operated at 65°C using 0.04N H₂SO₄ as eluant at a flow rate of 0.9 ml/min.

2.7. Productivity and yield

Lactic acid productivity (g.l⁻¹h⁻¹) is defined as the ratio

$$\frac{(P_t.V_t - P_0.V_0)}{(t_f - t_0)V_t}$$

Lactic acid production yield (g.g⁻¹) s calculated according to the amount of glucose consumed:

$$Y_{p/g} = \frac{(P_t.V_t - P_0.V_0)}{(G_0.V_0 - G_t.V_t) + (V_t - V_0).G_{feed}}$$

With : t_0 : initial time; t_f , final time, V_0 , initial volume; V_t , volume at time (t); G_0 , Initial glucose concentration; G_t , glucose concentration at time (t); P_0 , initial lactic acid concentration; P_t , lactic acid concentration at time (t); G_{feed} , glucose concentration of the feeding solution; Q , feeding solution flow rate.

3. Results

3.1. Effect of feeding rate

Fed-batch fermentations were performed to find the influence of the feeding rate on cell growth, glucose consumption and lactic acid production. For these experiments the initial batch phase performed with the production medium (see Material and Methods) lasted 24 h. For the fed phases, the date juice solution used for feeding had a glucose concentration of 62 g.l^{-1} and the feeding flows were of 150, 75 and 33 ml.h^{-1} .

The obtained results are indicated on Figure 1. They shows (Fig.1a) that at rather high feeding rate (150 ml.h^{-1}), the glucose is not completely consumed, its concentration is stabilized at 16 g.l^{-1} . The lactic acid productivity appears low ($0.8 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Table 1). In the second experiment, the feed rate was reduced at half this value (75 ml.h^{-1}). As shown in Figure 1b, lactic acid production is therefore greater (75 g.l^{-1}) and an improvement of the consumption of glucose (residual glucose, 10 g.l^{-1}) was observed. The lactic acid productivity was higher than previously ($1 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Table 1). In the third experiment the feeding rate was fixed at a lower value: 33 ml.h^{-1} . The final concentration in lactic acid was higher (89.2 g.l^{-1}), residual glucose was lower (2 g.l^{-1} , Fig.1c) and the lactic acid productivity became higher ($1.3 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Table 1). Thus, according to these results this third feeding rate, the lowest, seems to be the most suitable.

3.2. Influence of the complementation of the feeding medium.

In order to determine whether a limitation of the feeding medium (which could be either in nitrogen or other elements source, due to yeast extract) and salts (present in the production medium) exists and which could be an explanation for the low performances of the first two fermentations (glucose not exhausted, Figures 1, a and b). In the next experiment, the feeding medium of date juice at 62 g.l^{-1} glucose was complemented with the same components as the production medium. For this experiment the feeding rate was fixed at the lowest value, 33 ml.h^{-1} , because at this value the lactic acid productivity is the highest, and it is supposed that this is where the cells have the largest nutritional requirement.

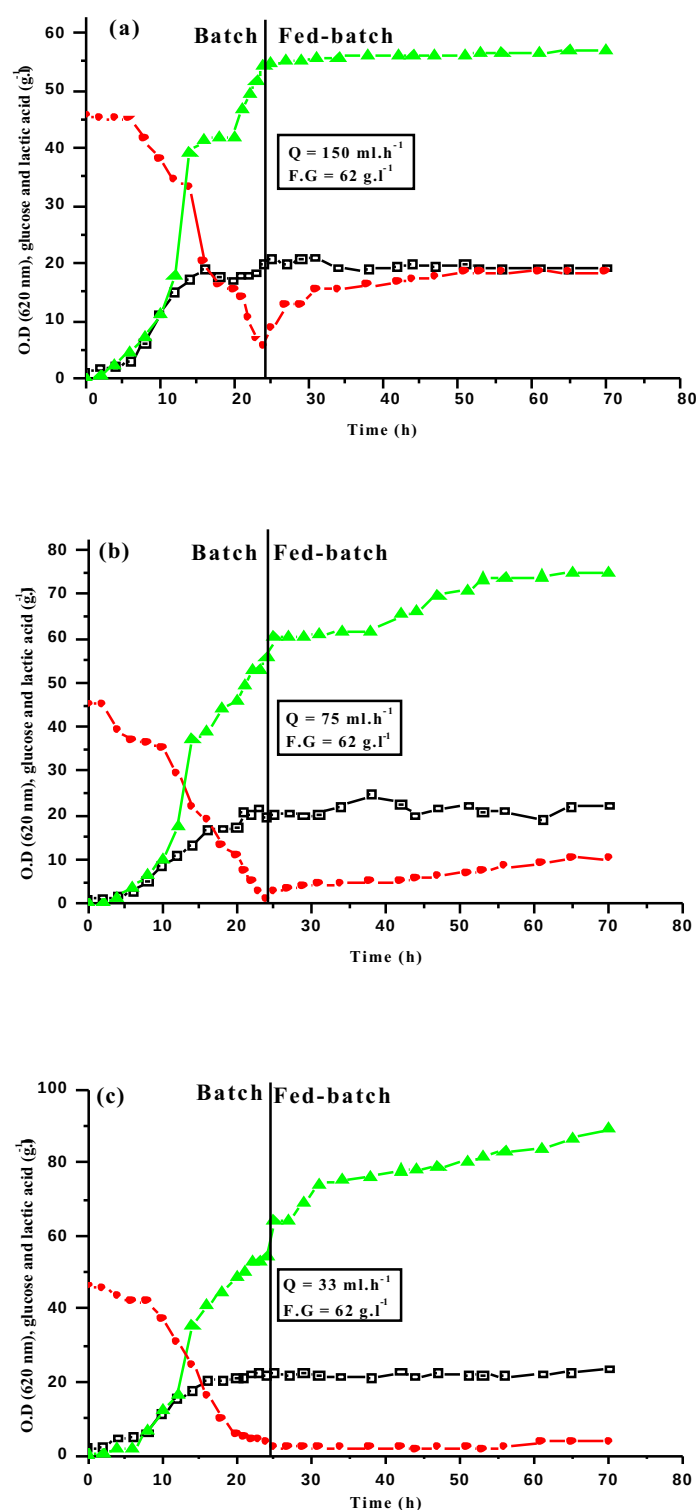


Figure 1 (a, b, c). Effect of feed rate on cell growth, residual glucose and lactic acid production in fed-batch culture using date juice glucose as feeding medium (62 g.l^{-1}). Symbols: ■, Cell growth; ●, residual glucose; ▲, lactic acid. Indices: Q = feed rate; $F.G$ = feeding glucose concentration.

Table 1. Effects of the feeding rate and the concentration of the feeding date juice glucose on the cell growth and lactic acid production.

Feeding rate (ml.h ⁻¹)	Feeding glucose (g.l ⁻¹)	Biomass concentration (g.l ⁻¹)	Final lactic concentration (g.l ⁻¹)	Lactic acid productivity (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	Lactic acid yield (g.g ⁻¹)
150	62	10.4	56.9	0.80	1.4
75	62	11.1	75.2	1.00	1.5
33	62	11.8	89.2	1.30	1.7
33	62 + supplements*	8.3	57.8	0.80	1.3
33	100	9.7	79.4	1.13	1.4
22	100	10.4	80.4	1.15	1.4
18	100	10.3	84.9	1.21	1.5

* supplements: are the same components as the production medium

The obtained results are indicated on Figure 2a. According to this figure, no real improvement is observed. It is even less effective: glucose is even less consumed (residual glucose being 10 g.l⁻¹, larger than 2 g.l⁻¹ obtained for the same assay performed without complementation, Figure 1c), the lactic acid production (57.8 g.l⁻¹), also lower than the previous one (89.2 g.l⁻¹) and productivity (0.8 g.l⁻¹.h⁻¹) remain low (Table 1). Moreover the results show that all the parameter values are lower than those obtained in the fed-batch culture using only date juice glucose (62 g.l⁻¹) as the feeding medium. So a complementation of the feeding medium in nitrogen source (yeast extract) and salt does not seem to improve the performances in fed-batch mode. It even decreases it.

3.3. Influence of the concentration of the feeding medium

To evaluate the effect of the concentration of the feeding medium (at a given flow rate, 33 ml.h⁻¹) the feeding date juice solution was used at a glucose concentration of 100 g.l⁻¹, and the results compared with those indicated on Figure 1c (feeding flow rate also at 33 ml.h⁻¹ but glucose concentration 62 g.l⁻¹). In these last conditions the glucose is not well consumed and its final concentration stabilizes between 8 and 10 g.l⁻¹ (Fig. 2b). The productivity was slightly low (1.1 g.l⁻¹.h⁻¹) and the final concentration in lactic acid (79.4 g.l⁻¹) is then even less than that obtained with feeding medium had a glucose concentration of 62 g.l⁻¹. It was then equal to 89.2 g.l⁻¹. So a combination of a glucose concentration of 100 g.l⁻¹ and of a flow rate feeding of 33 ml.h⁻¹ is not the best.

Apparently an increase of date juice glucose feeding decreases the fermentation performances.

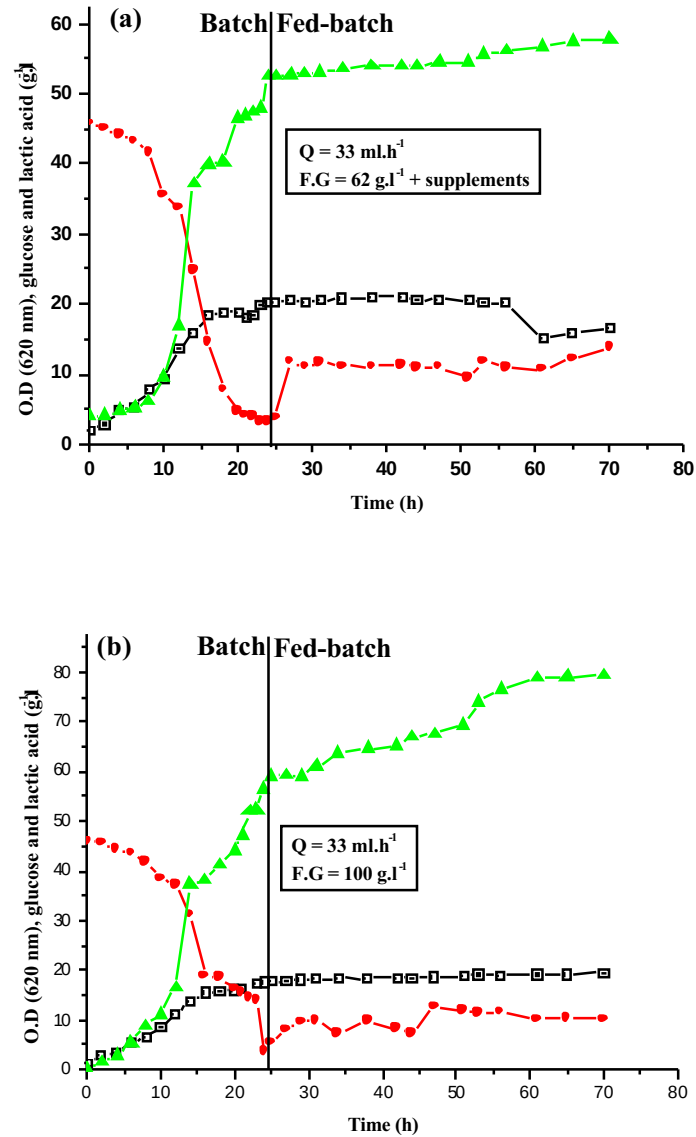


Figure 2 (a, b). Effect of the concentration of the feeding date juice glucose on cell growth, residual glucose and lactic acid production in fed-batch culture. Symbols: $\blacksquare$, Cell growth; $\bullet$, residual glucose; $\blacktriangle$, lactic acid. Indices: Q = feed rate; $F.G$ = feeding glucose concentration.

3.4. Fed batch assays at lower feeding rates

Due to the fact that at 33 ml.h^{-1} the performances are not the best (see above) two further fermentations were performed using the feeding date juice glucose solution at 100 g.l^{-1} but at two lower feeding rate values: 22 and 18 ml.h^{-1} . The results are indicated on Figure 3.

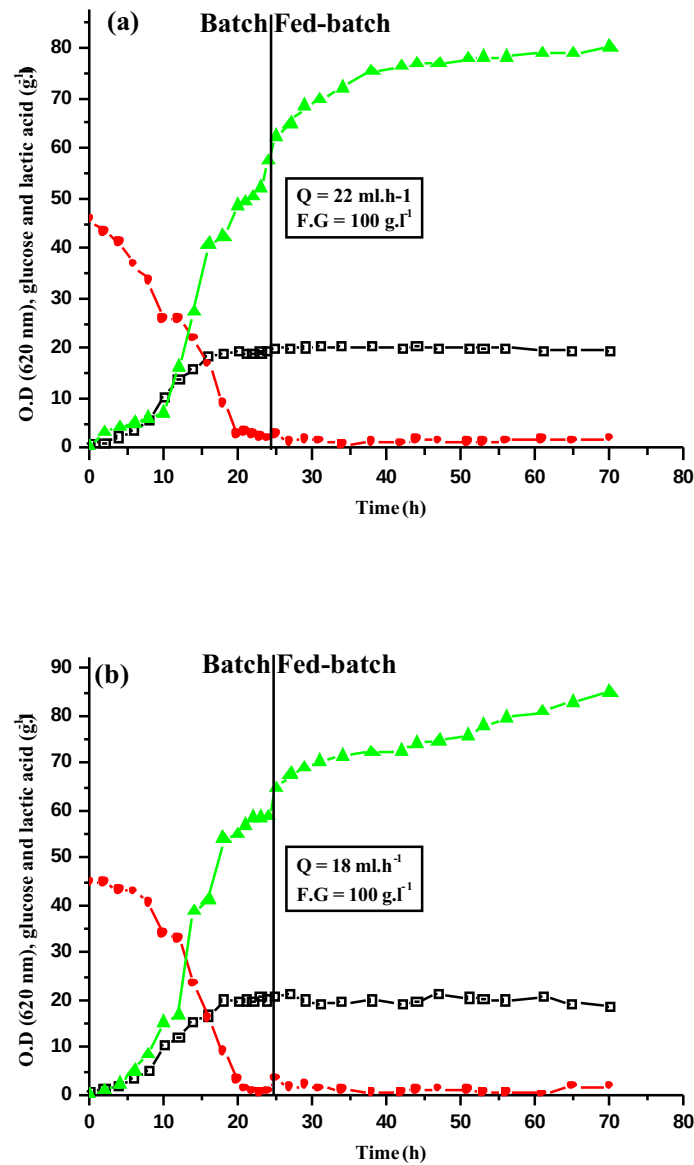


Figure 3 (a, b). Effect of the low feed rates on cell growth, residual glucose and lactic acid production in fed-batch culture using date juice glucose as feeding medium (100 g.l^{-1}). Symbols: ■, Cell growth; ●, residual glucose; ▲, lactic acid. Indices: Q = feed rate; F.G = feeding glucose concentration.

Those corresponding to the feeding rate of 22 ml.h⁻¹ are shown in Fig.3a and those obtained with a feeding rate of 18 ml.h⁻¹ are shown in Fig.3b. In comparison to the results indicated on Figure 2b (100 g.l⁻¹ et 33 ml.h⁻¹) in both assays the final concentration in lactic acid and the productivity are higher, respectively 80.4 g.l⁻¹ and 84.9 g.l⁻¹; 1.15 g.l⁻¹.h⁻¹ and 1.21 g.l⁻¹.h⁻¹ (Fig.3a; Table 1). The residual glucose concentrations are low, 1 g.l⁻¹ or less indicating higher glucose consumptions in both assays.

Figure 4 presents the results found at the different feeding rates 150, 75, 33, ml.h⁻¹ at a glucose concentration of 62 g.l⁻¹ (Figure 4a) and at 33, 22 and 18 ml.h⁻¹ at a glucose concentration of 100 g.l⁻¹ (Figure 4b). In both cases, as shown in these Figures, the final lactic acid concentration, productivity and yield decrease with the increasing of feeding rate.

4. Discussion

As stated in the introduction, there are only four studies which have been published about fed-batch lactic acid fermentations. In this regard the three most pertinent works were the following: i) That of Ding and Tan (2006) who were using an exponential substrate feeding trying to reach an appropriate feeding in order to avoid over or underfeedings. ii) That of Bai *et al.* (2003) who developed a process to optimize the production of ammonium lactate. iii) That of Roukas and Kotzekidou (1998) who worked on whey with repeated fed-batch by mixed cultures.

The aim of the present study was to determine the optimal feeding rate of date juice extract for maximum lactic acid volumetric productivity, concentration and yield, as well as low residual glucose concentration. Our results showed that the optimum feeding rate was 33 ml.h⁻¹ at a feeding date juice glucose concentration of 62 g.l⁻¹. As shown on Figure 4 lactic acid concentration and productivity decrease at higher feeding rate. This is similar to what has been observed by Roukas and Kotzekidou (1998) and Bai *et al.*, (2003).

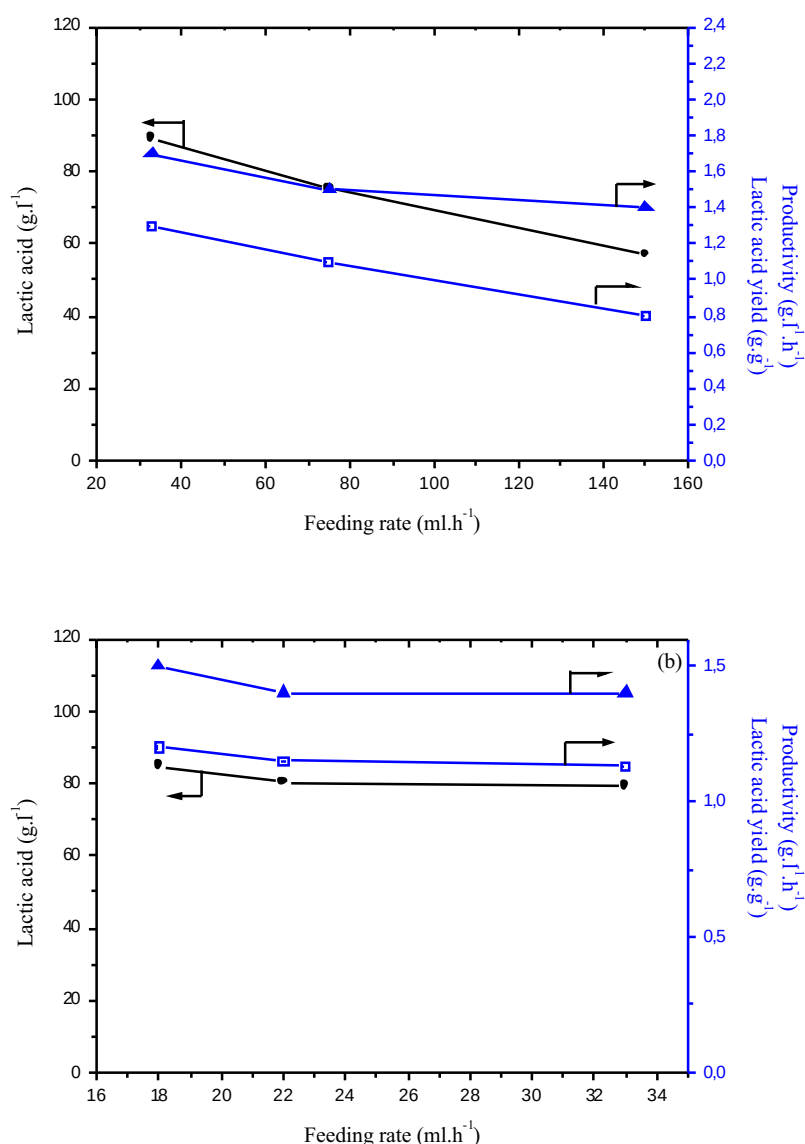


Figure 4 (a, b). Effect of feeding rate on kinetic parameters of date juice fermentation by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* in fed-batch culture. Symbols: ●, Lactic acid; ■, productivity; and ▲, lactic acid yield.

(a): glucose concentrations = 62 g.l⁻¹

(b): glucose concentrations = 100 g.l⁻¹

5. Conclusion

In fed-batch lactic acid fermentation, the two principal variables influencing volumetric productivity and lactic acid yield are the feeding rate and the concentration of the feeding medium. This study showed that maintaining a low feeding rate and increasing the concentration of the feeding medium gave a higher lactic acid production. The best result in terms of lactic acid production, volumetric productivity and lactic acid yield were obtained in fed-batch using date juice containing 62 g.l⁻¹ of glucose as feeding

medium at the feeding rate of 33 ml.h⁻¹, and fed-batch using date juice containing 100 g.l⁻¹ of glucose as feeding medium at the feeding rate of 18 ml.h⁻¹. Finally nitrogen source and salt supplementation of feeding medium was not key parameters for increasing the performance of fermentation.

Acknowledgments

This work was supported by the accord-programme N° COMDU 502 of Comité Mixte d’Evaluation et de Prospective (CMEP) between France and Algeria.

References

- Abou-Zeid, A.A., Bacshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1991. The formation of oxytetracycline in date-coat medium. *Biores. Technol.*, **37**, 179-184.
- Bai, D.M., Wei, Q., Yan, Z.H., Zhao, X.M., Li, X.G., and Xu, S.M., 2003. Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1833-1835.
- Chen, R., and Lee, Y.Y., 1997. Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 435-438.
- Choi, D.B., and Park, E.Y., 2006. Enhanced production of mouse alpha-amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. *Proc. Biochem.*, **41**(2), 390-397.
- Colombie, V., Bideaux, C., Goma, G., Uribe Larrea, J.L., 2005. Effects of glucose limitation on biomass and spiramycin production by *Streptomyces ambofaciens*. *Bioprocess Biosys. Eng.*, **28** (1), 55-61.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P. Moon, S.H. and Frank, J.R., 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16**, 221-231.
- Demirci, A., Pometto III A.L., Cox, D.J., 1999. Enhanced organically bound selenium yeast production by fed-batch fermentation. *J Agric. Food Chem.*, **47** (6), 2496-2500.
- Davison, B.E., Lianos, R.L., M.R., Redman, N.C., and Hillier, A.J., 1995. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid. *Int. Dairy J.*, **5**, 763-784.
- Ding, S. and Tan, T., 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies, *Process Biochemistry*, **41**, 1451-1454.
- Gschaedler, A., Thi Le, N., 1994. Boudrant, J., Glucose and acetate influences on the behaviour of a recombinant strain *Eschericia coli*, HB 101 (GAPDH), *J. Ind. Microbiol.* **13**, 225-232.
- Hofvebdahl, K. and Hahn-Hägerdal, B., 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 87-107.
- Litchfield, J.H., 1996. Microbiological production of lactic acid. *Adv. Appl. Microbiol.*, **42**, 45-95.

Lee, J., Lee, S.Y., Park, S., Middelberg, A.P.J., 1999. Control of fed-batch fermentations. *Biotechnology Advances*, **17**, 29-48.

Lee, J., Lee, S. Y., Park, S., 1997. Fed-batch culture of *Escherichia coli* W by exponential feeding of sucrose as a carbon source. *Biotechnol. Tech.*, **11** (1), 59-62.

Leroy, F. and de Vuyst, L., 2001. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion : a nutrient depletion model for the growth of lactic bacteria, *Appl. Env. Microbiol.*, **67**(10), 4407-4413.

Monteagudo, J.M., Rincon, J., Rodriguez, L., Fuertes, J., Moya, A., 1994. Dtermination of the best nutrient medium for the production of L-lactic acid from best molasses a statistical approach. *Acta Biotechnol.*, **13**, 103-110.

Nancib, A., Nancib, N. Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., and Boudrant, J., 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Biores. Technol.*, **96**, 63-67.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., and Boudrant, J., 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Biores. Technol.*, **78**, 149-153.

Nancib, N., Ghouli, M., Larous, L., Nancib, A., Adimi, L., Remmal, M., and Boudrant, J., 1999. Use of date products in production of the thermophilic dairy strain *Streptococcus thermophilus*. *Biores. Technol.*, **67**, 291-295.

Pontharangkul, T., Demirci, A., 2006. Effects of fed- batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**, 73-79.

Roukas, T., and Kotzekidou, P., 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 199-204.

Varadarajan, S. and Miller, D.J., 1999. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. *Biotechnol. Prog.*, **15**, 845-854.

Vink, E.T.H. Rabago, K.R., Glassner, D.A., and Gruber, P.R., 2003. Applications of life cycle assessment to Nature Works polylactide (PLA) production. *Polym. Degrad. Stabil.*, **80**, 403-419.

CHAPITRE V

Cultures Continues

Etude des cinétiques et des performances en culture continue

La productivité des fermentations en mode discontinu n'est pas optimale d'un point de vue économique. En conséquence, nous nous sommes intéressés au mode continu pour améliorer ce paramètre économique

Le premier objectif de ce travail est d'utiliser l'extrait bactérien en culture batch comme étant une alternative économique par rapport à l'extrait de levure en tant que source d'azote relativement cher.

Le second objectif est d'évaluer les effets de différents taux de dilution en culture continue sur la croissance et la production d'acide lactique. Ceci nous permet d'étudier le comportement de la souche dans ce mode de culture puis déterminer le taux de dilution optimal afin d'améliorer les performances de production d'acide lactique.

Finalement, nous comparons les cinétiques de croissance dans les deux mode de conduite: discontinu et continu; nous dégagerons les paramètres d'une conduite optimale de production d'acide lactique.

- Chapitre V -
Cultures continues: Batch and continuous of lactic acid from date juice by
Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus

SOMMAIRE

Abstract	156
1. Introduction	156
2. Materials and methods	157
2.1. Microorganism	157
2.2. Date juice extract	158
2.3. Production medium	158
2.4. Preparation of bacterial extract	158
2.5. Culture conditions	159
2.6. Analytical methods	159
3. Results	159
3.1. Effect of supplementation date juice with yeast extract and bacterial extract	159
3.2. Continuous fermentations	160
3.2.1. Preliminary batch fermentation	160
3.2.2. Effect of dilution rate on kinetic parameters and lactic acid productivity	163
3.2.3. Feeding of date juice supplemented with yeast extract and salts	167
4. Discussion	168
5. Conclusion	169
References	169

Batch and continuous production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

Aicha Nancib ^a, Nabil Nancib ^a, Joseph Boudrant ^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, 19000 Setif, Algeria

^b LSGC-CNRS-ENSAIA, BP, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract

Lactic acid production from date juice by batch and continuous fermentations of *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* was investigated. Batch fermentations studies were performed to evaluate the potential of bacterial extract as an alternative to yeast extract for the economical production of lactic acid. As a result, 1% yeast extract could be successfully replaced with 3% bacterial extract supplemented with vitamin B complex. In the batch fermentation, maximum yield (1.74 g.g^{-1}) and maximum lactic acid volumetric productivity ($2 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$) were achieved at 45 g.l^{-1} date juice glucose concentration with 10 g.l^{-1} yeast extract. The influence of dilution rate (D) on lactic acid production was investigated during continuous cultures. The growth kinetics of *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* and lactic acid production were assessed at a range of dilution rates (0.017 h^{-1} to 0.07 h^{-1}). The results obtained showed that the dilution rate influences the fermentation pattern, modifying various fermentation parameters. The maximum lactic acid (96.4 g.l^{-1}) was obtained at a dilution rate of 0.033 h^{-1} while the maximum lactic acid productivity ($3.81 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$) occurred at $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$. The enrichment of the feeding medium at $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ resulted in improvements in lactic acid concentration (104.3 g.l^{-1}).

Keywords : Batch culture, continuous culture ; date juice ; *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* ; lactic acid

1. Introduction

Lactic acid is a potential chemical, which can be used as a preservative, acidulant, and flavour in food, textile, and pharmaceutical industries, and a raw material for lactate ester, propylene glycol, 2,3-pentanedione, propanoic acid, acrylic acid, acetaldehyde, and dilactide in chemical industries (Akerberg and Zacchi, 2000; Varadarajan and Miller, 1999; Vick Roy, 1985). The current demand on lactic acid has considerably

increased due to its potential use as a monomer for the production of biodegradable polymer, polylactic acid (PLA), which can be substituted for synthetic polymers derived from petroleum resources (Datta *et al.*, 1995). Industrial process for the production of lactic acid typically use sucrose from cane and beet sugar, whey containing lactose, and maltose and dextrose from hydrolysed starch (Vick Roy, 1985; Duxbury, 1993). Most studies for lactic acid production are focused on using whey (Mehaia and Cheryan, 1987; Roy *et al.*, 1986), molasses (Gomez and Garcia, 1993; El-sherbiny *et al.*, 1986; Aksu and kutsal, 1986) and a synthetic medium containing pure lactose, sucrose or dextrose (Suscovik *et al.*, 1992; Gonçalves *et al.*, 1991).

However, studies on lactic acid production from date juice are rather limited (Nancib *et al.*, 2005; Nancib *et al.*, 2001). In the fact dates is a convenient raw material for lactic acid fermentation since it contains a high concentration of sugars. Dates contain between 68 and 81% by weight of easily extractable sugars, predominantly glucose and fructose, amino acids, minerals and requires only a little handling before fermentation. Thus date products, besides food, could be considered as suitable agricultural materials for the production of different compounds, essentially for the damaged fruits. Various investigations have been carried out on the production of different or a few products such as oxytetracycline (Abou-Zeid *et al.*, 1993), baker's yeast (Nancib *et al.*, 1997; Jalaluddin *et al.*, 1995) and thermophilic dairy starter (Nancib *et al.*, 1999).

The present study concerns assays directed toward the improvement of lactic acid production and productivity and so the reduction of the manufacturing costs of lactic acid fermentation process from date juice. The first objective of this work was to use bacterial extract in batch culture as alternative to the expensive yeast extract used as the source of nitrogen. The second objective was to evaluate the effects of different dilution rates in continuous cultures on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, and to estimate production kinetic parameter values, including the maximum specific production rate, lactic acid yield and productivity. The data obtained allowed us to determine conditions allowing optimum performance.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* NRRL-B445, a homofermentative lactic acid producer, was used. Stock cultures (1 ml) were stored at – 20°C in *Lactobacilli* MRS medium with 25% (v/v) glycerol.

2.2. Date juice extract

The method used was adapted from Nancib *et al.* (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting and tap water added at a ratio of two parts of water to one part of dates (V/W). The mixture was heated at 80°C for 2h with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min. to separate the cellulosic debris. The supernatant was recovered and used essentially as the carbon source in the fermentation medium. The glucose content of the collected supernatant was determined. Immediately and prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice was diluted to desired concentration of glucose. while the supernatant was essentially as the carbon source in the fermentation medium. The glucose content of the collected supernatant was determined.

2.3. Production medium

The medium for the cultures had the following composition: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g.l⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03 g.l⁻¹; KH_2PO_4 , 3 g.l⁻¹; K_2HPO_4 , 3 g.l⁻¹; $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 g.l⁻¹ and Tween 80, 1ml.l⁻¹. For batch and continuous fermentations, the concentration of date juice and yeast extract (used mainly as a nitrogen source), were respectively 45 g.l⁻¹ and 10 g.l⁻¹. For flask culture the concentration of date juice glucose was 50 g.l⁻¹.

2.3. Preparation of bacterial extract

As stated above, the replacement of yeast extract, which is an expensive component, by bacterial extracts has been deepened. For that fermentation broth was recovered after batch fermentation and centrifugation (18.000g for 20 min). 200 ml of concentrated cell debris was hydrolysed with 10 N HCl at 100°C for 2h 30min. After filtration the supernatant was recovered and used as a nitrogen source in the fermentation medium in place of yeast extract.

The date juice was supplemented with the corresponding bacterial extract (3% p/v) as nitrogen source and also with vitamin B complex (Nancib *et al.*, 2005). The concentration of B vitamins added, per liter of medium: folic acid, 0.3 mg; riboflavine,

1 mg; biotine, 0.03 mg; panthothenate, 4 mg; pyridoxine, 1 mg and nicotinic acid, 10 mg.

2.5. Culture conditions

Different kinds of assays (flask and fermentor) were performed. In each case a preliminary inoculum was prepared. The inoculum was obtained by transferring glycerol stock culture (1 ml) to an Erlenmeyer flask containing 100 ml of liquid MRS medium for preculture. The flask was subsequently incubated at 38°C for 12h, the time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase. A 10% inoculum grown in the MRS medium was used in all fermentations (flask and fermentor).

Flask experiments were carried out in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of production medium. A 6.0 l jar fermentor (LKB) was employed for cultivation operations with an initial culture volume of 3.0 l. The pH was regulated at 6.0 with 5M NH₄OH. The temperature was kept at 38°C and the agitation speed was 150 rpm.

Fermentor experiments mainly for continuous cultures were operated at a variety of dilution rates (0.017 to 0.07 h⁻¹). Initially the fermentation was carried out in batch operation for 15h after which continuous fermentation was started.

2.6. Analytical methods

Biomass concentration was estimated by optical density measurement at 620 nm and calibrated to the cell dry weight. Dry cell concentration was calculated from the optical density (OD₆₂₀) with a linear correlation factor (one OD₆₂₀ = 0.5 g dry cell weight). Total nitrogen concentration was measured using the Kjeldahl method. Lactate and glucose were measured using enzymatic kit from Sigma.

3. Results

The assays performed here consisted in the studies of the replacement of yeast extract of the production medium with a cheaper similar product. For that a bacterial extract obtained from the used lactic bacteria was prepared and used. Then fermentations were also performed mainly in continuous ways to determine optimum conditions.

3.1. Effect of supplementation date juice with yeast extract and bacterial extract

The corresponding assays were performed in Erlenmeyer flasks. To improve the economic parameters of lactic acid fermentation, bacterial extract was substituted with yeast extract (10 g.l⁻¹) on equivalent nitrogen bases using date juice with 50 g.l⁻¹ initial

glucose concentration. The amount of extract bacterial (3%) was calculated to give the equivalent nitrogen of 1% yeast extract. As shown in Figure 1 (a), yeast extract yielded the highest final concentration of lactic acid compared with bacterial extract. The specific production rate of $0.4 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ was obtained without addition of nutrient supplements. The addition of yeast extract, bacterial extract and bacterial extract with vitamin B complex increased the specific production rate by 85%, 40% and 65% respectively (Table 1). We remind that the positive action of vitamin B complex has been observed previously (Nancib *et al.*, 2005), and this is the reason such experiment has been carried out.

Figure 1(b) shows the decreases of glucose concentration during the fermentation process with the additional nutrient supplements. With no nutrient supplement added to the date juice, 23% of glucose was utilized within 25h of fermentation. When yeast extract, bacterial extract, and bacterial extract with vitamin B complex were added, the same percentage of glucose (23%) was utilized after 14, 22 and 18h respectively. The yeast extract and bacterial extract reduced the time required for the completion of fermentation. When vitamin B complex was added to date juice supplemented with bacterial extract, the improvement in specific production rate and volumetric productivity were given (Table 1). Figure 1(c) show the increases in biomass concentration, which shows the positive effect of bacterial extract, enhanced with B vitamin, and yeast extract, compound which remains the most efficient.

These results show the potentiality of bacterial hydrolyzate extract of *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* with vitamin B supplementation to increase lactic acid production rate and volumetric productivity in comparison with date juice no supplemented (Table 1). Since the results were better with yeast extract, it has been decided to performed the next assays, mainly in a continuous way with yeast extract, and not bacterial hydrolyzate extract.

3.2. Continuous fermentations

3.2.1. Preliminary batch fermentation

One batch culture was performed in order to know what are the performances obtained with the production medium and the conditions described in Materials and methods, and also to compare it's with those that will be obtained with the continuous assays.

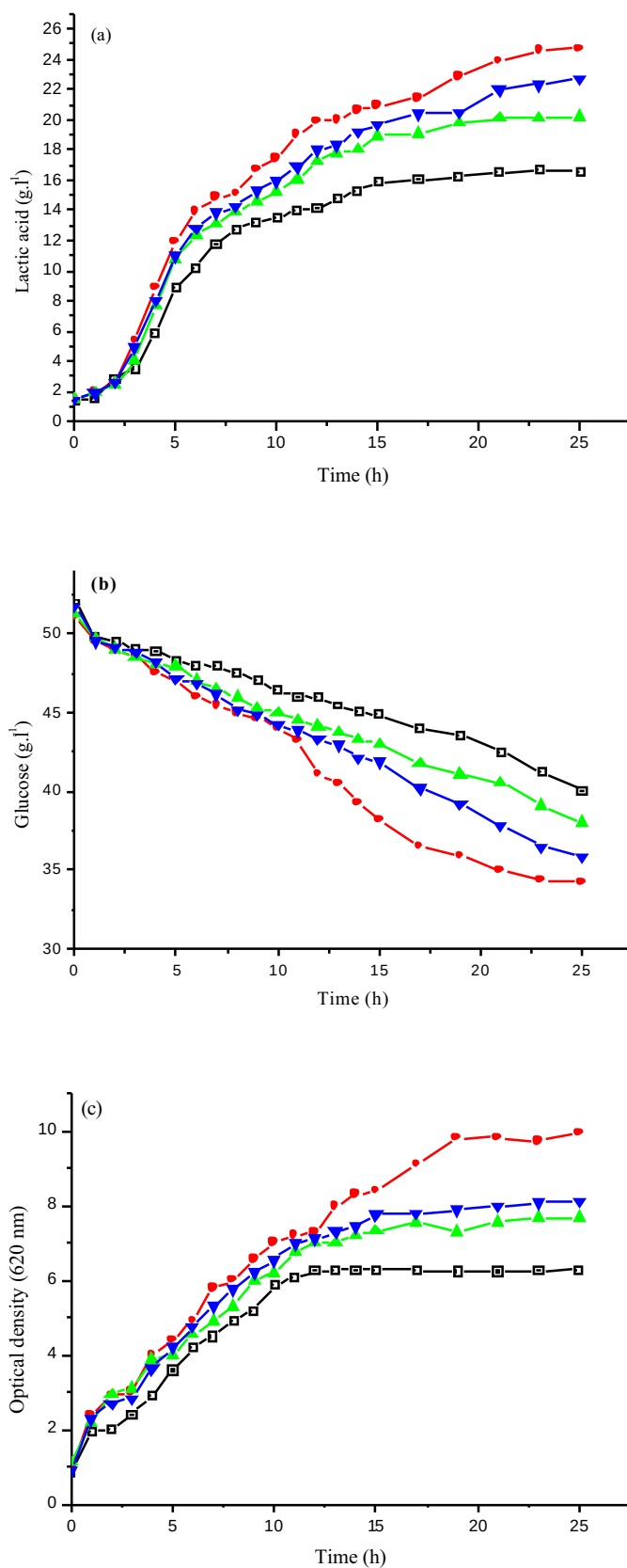


Figure 1. Effect of yeast extract and bacterial extract on lactic acid production (a), glucose consumption (b) and cell growth (c). (■) unsupplemented date juice; (▲) date juice + bacterial extract; (▼) date juice + bacterial extract and vitamin B complex; (●) date juice + yeast extract.

Table 1. Effect of supplementing date juice with yeast extract and bacterial extract (initial glucose concentration: 50 g.l⁻¹)

	Nitrogen source supplemented			
	0	Yeast extract	Bacterial extract	Bacterial extract (vitamin B complex)
Maximal specific production rate (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0.40	0.74	0.56	0.66
Lactic acid (g.l ⁻¹)	16.6	25.1	20.15	22.7
Biomass (g.l ⁻¹)	3.14	4.97	3.83	4
Lactic acid yield (g.g ⁻¹)	1.2	1.4	1.24	1.33
Glucose use (%)	23	33	26	31
Lactic acid productivity (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	0.6	1	0.8	0.9

The amount of nitrogen of bacterial extract was set as that which yielded a nitrogen concentration of 10 g.l⁻¹ yeast extract equivalent.

The concentration of B vitamins added, per liter of medium: folic acid, 0.3 mg; riboflavine, 1 mg; biotine, 0.03 mg; Cad-panthothenate, 4 mg; pyridoxine-HCl, 1 mg and nicotinic acid, 10 mg.

As shown in Figure 2, the glucose was consumed completely, and final lactic acid concentration was 80.45 g.l⁻¹. A lactic acid yield of 1.74 g.g⁻¹ and lactic acid productivity of 2 g.l⁻¹.h⁻¹ were obtained at the end of fermentation (Table 3). Following these assays several continuous fermentations were carried out in order to measure the effect of dilution rate on kinetic parameters. As stated above, the production medium contained yeast extract and not bacterial hydrolysate extract.

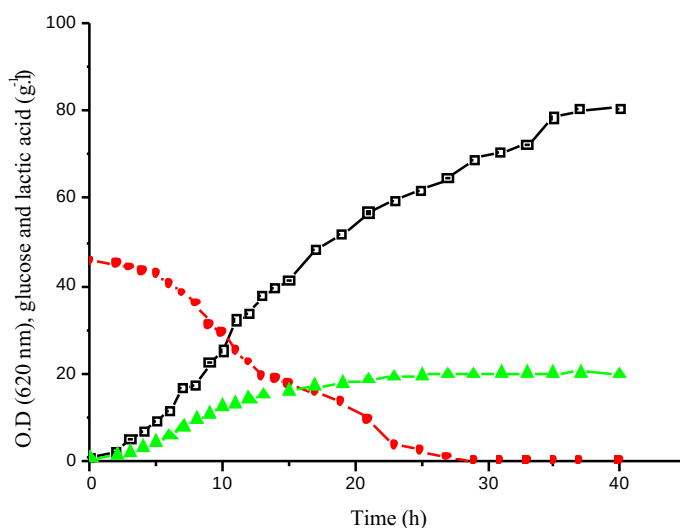


Figure 2. Time courses of lactic acid production (■), cell growth (▲) and glucose consumption (●) in batch fermentation of date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

3.2.2. Effect of dilution rate on kinetic parameters and lactic acid productivity

In order to provide information on substrate utilization and volumetric productivities over a wide range of dilution rates, continuous cultures of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* were investigated. The date juice glucose concentration in production medium was 45 g.l⁻¹. The feeding medium (date juice glucose) was fed at a 64 g.l⁻¹. Dilution rates analysed were between 0.017 h⁻¹ and 0.7 h⁻¹. The steady-state values for biomass, lactic acid and date juice glucose concentration for each dilution rate are shown in Figure 3 (a, b, c).

Table 2 shows the kinetic parameters of the continuous concerning lactic acid production from date juice at various dilution rates. By scanning the entire range of dilution rates tested, it was noticed that maximum lactic acid concentration (96.4 g.l⁻¹) was obtained at $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ with residual glucose of 28.5 g.l⁻¹. Increasing the dilution rates above 0.033 h⁻¹, resulted in a decrease in both lactic acid and biomass and an increase in residual glucose concentrations (Figure 4, Table 2).

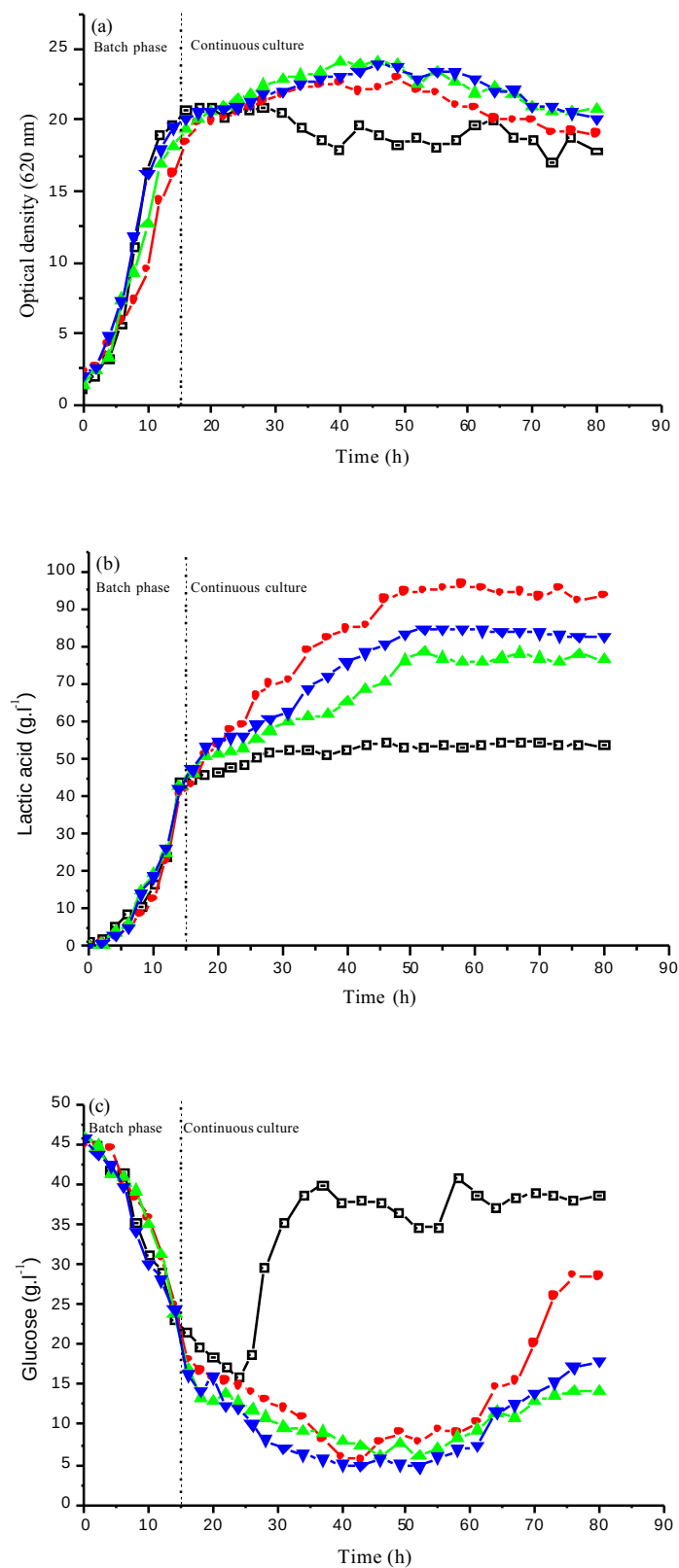


Figure 3 (a, b, c). (a), Cell growth; (b), lactic acid concentration and (c), residual glucose concentration at different dilution rates $\blacktriangle$: $D = 0.017 \text{ h}^{-1}$, $\blacktriangledown$: $D = 0.025 \text{ h}^{-1}$, $\bullet$: $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$, $\blacksquare$: $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$

Table 2. Kinetic parameters in continuous fermentation using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

Kinetic parameter	Dilution rate, D (h ⁻¹)				
	0.017	0.025	0.033	0.07	0.033*
Maximal specific production rate of lactic acid (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0.28	0.42	0.56	0.40	1.00
Maximal specific consumption rate of glucose (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0.42	0.54	0.53	0.38	0.58
Maximal concentration of biomass (g.l ⁻¹)	12.05	11.70	11.30	10.45	11.95
Residual glucose concentration (g.l ⁻¹)	14.23	17.90	28.48	38.56	15.22
Maximal concentration of lactic acid (g.l ⁻¹)	78.52	84.63	96.42	54.52	104.25
Volumetric lactic acid productivity (g.l ⁻¹ h ⁻¹)	1.33	2.11	3.20	3.81	3.44
Specific lactate productivity (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0.11	0.18	0.30	0.40	0.29
Volumetric biomass productivity (g.l ⁻¹ h ⁻¹)	0.20	0.29	0.37	0.73	0.39
Lactate yield (g.g ⁻¹)	1.53	1.79	2.61	2.06	2.04

* Feeding medium has a similar composition as the production medium

Table 3. Comparative performances between batch and continuous cultures of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

	Batch culture	Continuous culture (D = 0.033 h ⁻¹)
Lactic acid yield (g.g ⁻¹)	1.74	2.61
Productivity (g.l ⁻¹ .h ⁻¹)	2	3.2
Lactic acid concentration (g.l ⁻¹)	80.45	96.42

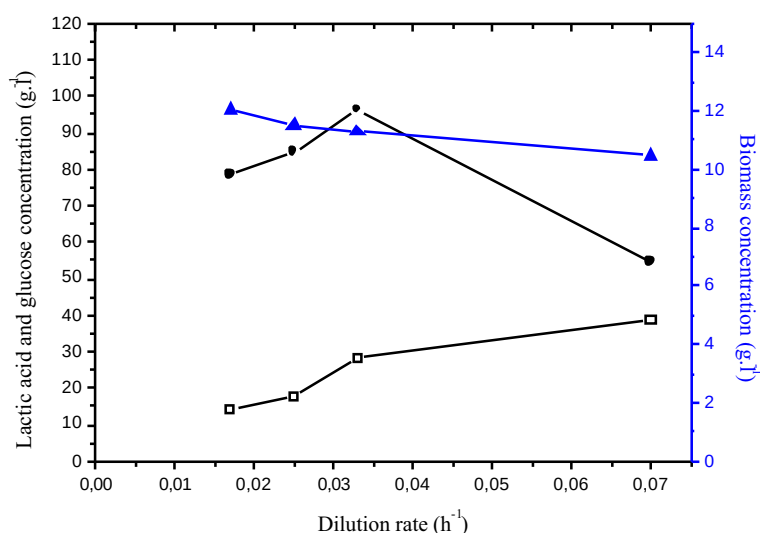


Figure 4. Effect of dilution rate on biomass (▲), glucose (□) and lactic acid (●) concentrations in the *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* fermentation.

Figure 5 shows the effect of dilution rate on the rate of both lactic acid and biomass productivity. Both lactic acid and biomass volumetric productivities increased gradually with the increase of dilution rate. Maximum volumetric lactic acid productivity ($3.81 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and biomass productivity ($0.73 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) were obtained at a dilution rate of 0.07 h^{-1} . In most cases high volumetric productivity is coupled to incomplete use of the substrate. Gomez and Garcia (1993) studied lactic acid production from cane molasses with *Lactobacillus plantarum* and determined the performance of conventional continuous culture at product maximum volumetric productivity linked to low lactic acid concentration and high residual concentration of molasses total sugars.

These results show that there are two zones of dilution rate that are of particular interest concerning lactic acid production from date juice: around $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$ where the productivity of the system is at a peak, and below $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ where lactic acid concentration is at a maximum.

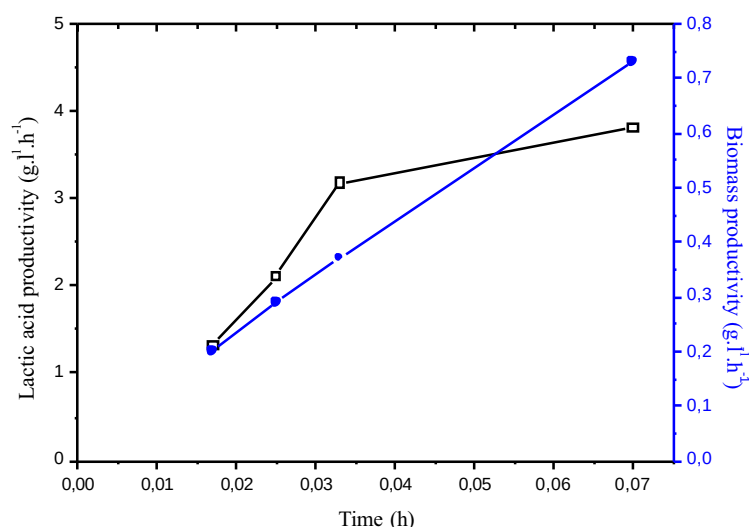


Figure 5. Effect of dilution rate on biomass productivity (●) and lactic acid productivity (□) in the *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* fermentation.

3.2 3. Feeding of date juice supplemented with yeast extract and salts

The feeding medium containing only date juice was not a well-balanced bacterial growth medium to support the good *Lactobacillus casei* growth necessary to obtain high quantities of lactic acid. As shown earlier (Nancib *et al.*, 2005), the improvement of lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* from date juice supplemented with yeast extract and salt compared to date juice without supplementation, reflected the complex demand for nitrogen source of *Lactobacillus casei*. In order to improve the lactic acid production, the feeding medium (date juice glucose 64 g.l⁻¹) was supplemented with the same compounds as the production medium by keeping the dilution rate at 0.033 h⁻¹. The results showed, that lactic acid production was increased (104.3 g.l⁻¹) and the residual glucose decreased to 15, 2 g.l⁻¹ compared with unsupplemented feeding medium respectively 96.42 g.l⁻¹ and 28.48 g.l⁻¹ (Figure 6, Table 2). These results show the changes in the specific lactic production rate (1 g.g⁻¹.h⁻¹) practically a fold of that obtained in continuous with unsupplemented feeding medium. The most important parameter for lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* is the nitrogen source.

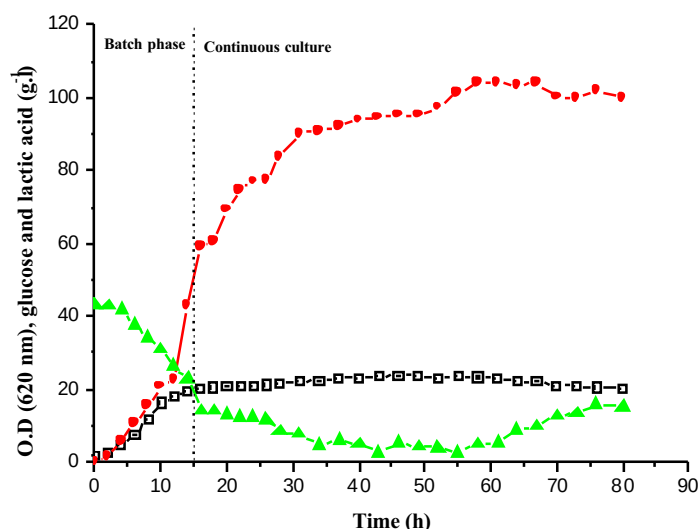


Figure 6. Influence of the enrichment of the feeding medium on cell growth (■); residual glucose (▲) and lactic acid (●).

4. Discussion

Most lactic acid bacteria require a wide range of growth factors including amino acids, vitamins, fatty acids, purines, and pyrimidines for their growth and biological activity (Moat, 1985). Several studies showed that lactic acid productivity of most *Lactobacilli* is significantly improved by the addition of yeast extract (Kwon *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 1997; Hujanen and Linko, 1996). However, the use of this nutrient supplement in large quantities is very expensive and can reach as high as 32% of the total lactic acid production cost (Norton *et al.*, 1994). Our results showed that (in Erlenmeyer), yeast extract (1%) can be replaced with bacterial extract (3%) supplemented with vitamin B complex. However we observed that yeast extract gave the highest concentration in lactic acid (25 g.l⁻¹ in regard of 23 g.l⁻¹ in Erlenmeyer (Table 1)). The productivity of lactic acid in a conventional batch process is usually limited by the low concentration of microbial cells in a fermentor or it may be inhibited by an undissociated form of lactic acid (Gätje and Gottschalk, 1991). On the other hand, the continuous cultivation can provide several advantages over the batch one, such as increased productivity and better process control.

Concerning the fermentor assays (this time performed with yeast extract), the batch one lead to a lactic acid production yield (1.74 g.g⁻¹) and maximum volumetric productivity (2 g.l⁻¹.h⁻¹, Table 3) were observed. As for the continuous assays, the dilution rate clearly affected all important fermentation parameters in the continuous cultivation of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Both specific lactate productivity, lactate and

biomass volumetric productivities increased gradually with increase of dilution rate, while the lower concentration of lactic acid and higher residual glucose were obtained. The presence of excess sugars in higher dilution rate cultures and their maximum utilization at lower dilution rates have also been reported by Göksungur and Güvenç (1997); Gonzalez *et al.*, (1996); Abdel-Naby *et al.*, (1992); Major and Bull (1989). The enrichment of the feeding medium as the initial production medium at $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ resulted in improvement in lactic acid concentration. Yeast extract is essential for a good fermentation performance (Nancib *et al.*, 2005). It is assimilated as the nitrogen source and contains vitamins and cofactors for growth (Aeschlimann and Stockar, 1990).

5. Conclusion

In this study batch and continuous fermentations of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* were carried out. In batch mode, lactic acid production yield (1.74 g.g^{-1}) and maximum volumetric productivity ($2 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) were observed. Medium cost could be reduced by substituting yeast extract with bacterial extract.

In continuous mode two important zones of dilution rate were determined: $D = 0.07 \text{ h}^{-1}$ where the volumetric productivity of the system is at a peak ($3.8 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), and $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ where the highest lactic acid concentration was obtained (96.2 g.l^{-1}). The enrichment of the feeding medium as the initial production medium at $D = 0.033 \text{ h}^{-1}$ resulted in improvement in lactic acid concentration (104.3 g.l^{-1}).

References

- Abdel-Naby, M., Mock, C., Lee, C., 1992. Production of organic acids from enzymatic hydrolysate of starch by immobilized lactic acid bacteria. UNIDO proceedings, Korea, 227-243.
- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlhaf, A.O., 1993. Utilization of date products in production of oxytetracycline by *streptomyces rimosus*. J. Chem. Technol. Biotechnol. **58**, 77-79.
- Aeschlimann, A., Von Stockar, U., 1990. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**, 398-402.
- Akerberg, C., Zacchi, G., 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. Bioresour. Technol. **75**, 119-126.

- Aksu, Z. and Kutsal, T., 1986. Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together. *Biotech. Lett.* **8**, 157-160.
- Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., Franck, J. H., 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 221-231.
- Duxburry, D.D., 1993. Lactic acid. *Food Processing, USA.* **54**, 97-98.
- El-Sherbiny, G.A., Rizk, S.S., Yousef, G.S., 1986. Utilization of beet molasses in the production of lactic acid. *Egyptian J. Food Science.* **14**, 91-100.
- Gätje, G., Gottshalk, G., 1991. Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 446-449.
- Göksungur, Y., Güvenç, U., 1997. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 399- 404.
- Gomez, V.R. and Garcia, J.L., 1993. Lactic acid productivity in continuous culture of cane molasses with *Lactobacillus plantarum*. *Proceedings of the first lactic acid bacteria computer conference*, eds E. L. Foo, R. Griffin, R. Moelby & C.G. Heden. Horizon Scientific Press, London. 107-110.
- Gonçalves, L.M.D., Xavier, A.M.R.B., Almeida, J.S., Carronodo, M.J.T., 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme. Microbiol. Technol.* **13**, 314-319.
- Gonzalez-Vara, A., Pinelli, D., Rossi, M., Fajner, D., Magelli, F., Matteuzzi, D., 1996. Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 548-552.
- Hujanen, M. and Linko, Y-Y., 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on (L+)- lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 307-313.
- Jalaluddin, A.K., Abulnaja, K.O., Kumosani, T.A., Abou-Zeid, A.A., 1995. Utilization of saudi date sugars in production of baker's yeast. *Biores. Technol.* **53**, 63-66.
- Kwon, S., Lee, P.C., Lee, E.G., Chang, Y.K., Chang, N., 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enz. Microbiol. Technol.* **26**, 209-215.
- Major, N.C. and Bull, A.T., 1989. Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotech. Lett.* **6**, 401-405.
- Mehaia, M.A. and Cheryan, M., 1987. Production of lactic acid from sweet whey permeates concentrates. *Process. Biochem.* **22**, 185-188.

Moat, G., 1985. Biology of the lactic, acetic and propionic acid bacteria, Ed. By DEMAIN, A.L., SOLORAN, N.A., in Board London Amsterdam, Biology of Industrial Microorganism, 160-188.

Nancib, N., Nancib, A., Boudrant, J., 1997. Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. Biores. Technol. **60**, 67-71.

Nancib, N., Ghoul, M., Larous, L., Nancib, A., Adimi, S., Remal, M., Boudrant, J., 1999. Use of date products in production of the thermophilic dairy strain *Streptococcus Thermophilus*. Biores. Technol. **67**, 291-295.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjellal, A., Bensliman, C., Blanchard, F., Boudrant, J., 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. Biores. Technol. **78**, 149-153.

Nancib, A., Nancib, N., Meziane- Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., Boudrant, J., 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. Biores. Technol. **96**, 63-67.

Norton, S., Lacroix, C., Veillemand, J.C., 1994. Kinetic study of continuous by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Enz. Microbiol. Technol. **16**, 457-466.

Roy, D., Goulet, J., LeDuy, A., 1986. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. **24**, 206-213.

Suskovic, J., Beluhan, D., and Kurtanjek, Z., 1992. Mathematical model and estimation of kinetic parameters for production of lactic acid by *Lactobacillus delbruckeii*. Chem. Biochem. Eng. **6**, 127-132.

Varadarajan, S., Miller, D.J., 1999. Catalytic upgrading of fermentation derived organic acids. Biotechnol. Prog., **15**, 845-854.

Vick Roy, T.B., 1985. Lactic acid. In: Moo-Young M, editor. Comprehensive Biotechnology, vol. **3**. New York: Pergamon Press, p. 761-776.

Yoo, I.K., Chang H.N., LEE, E.G., Cahang, Y.K., Moon, S.H., 1997. Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei*. J. Fermentation. Bioengineering. **84**, 172-175.

CHAPITRE VI

Modélisation

Modélisation de la conversion du glucose et du fructose du jus de datte en acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

Généralement, la modélisation se fait sur milieux synthétiques où les bilans matières peuvent être faits. Sur milieux complexes, la modélisation est plus compliquée car les substrats ne sont pas tous identifiés.

Parmi les modèles développés pour la fermentation lactique, peu ou pas ont été établis sur des cinétiques correspondantes à des situations où différents substrats sont consommés. Dans le cas de la fermentation sur jus de datte, deux substrats: le glucose et le fructose, sont co-métabolisés par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*.

Le travail de modélisation que nous allons réaliser doit nous permettre d'optimiser la production d'acide lactique en culture discontinue. Les hypothèses du modèle ont été établies sous la forme d'équations mathématiques de façon à représenter les cinétiques de consommation simultanée du glucose et du fructose, de la croissance et de la production d'acide lactique.

- CHAPITRE VI -
Modélisation: Kinetics of batch production of lactic acid from date juice sugars by
Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus

SOMMAIRE

Abstract	175
1. Introduction	175
2. Materials and methods	176
2.1. Microorganism and growth conditions	176
2.2. Date juice extract	177
2.3. Production medium	177
2.4. Batch fermentation	177
2.5. Analytical methods	177
3. Model development	178
3.1. Cell growth	178
3.2. Substrates (glucose and fructose) utilization	179
3.3. Product (lactic acid) production	181
4. Model identification	182
5. Conclusion	186
References	186

Kinetics of batch production of lactic acid from date juice sugars by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

Aicha Nancib^a, Nabil Nancib^a, Frantz Fournier^b and Joseph Boudrant^b

^aDepartment of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria

^bLSGC-CNRS-ENSAIA, BP 172, Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les Nancy, France

Abstract

A kinetic model for cell growth, simultaneous utilization of glucose and fructose and lactic acid production in batch fermentation from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* was developed. A modified Luedeking-Piret equation was incorporated into the model. The model accounts for the effect of substrates limitation and cell death on the cell growth, substrate utilization and lactic acid production during the fermentation process. From the results, at low initial concentration of substrates the simulation provides a good fit of the experimental data. When compared with batch experimental data, at high initial concentration of substrate, the model provided correct prediction for growth, substrates utilization and lactate production during the first 15 hours. After this period of fermentation, a difference between the resulting experimental ones and simulation are observed. This model is not yet satisfactory and remains to be improved.

Key words: *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*, lactic acid, kinetic modeling, date juice sugars

1. Introduction

Lactic acid has a wide range of applications in the food, pharmaceutical and cosmetics industries (Datta *et al.*, 1995; Hujanen and Linko, 1996). In recent years, new applications, such as degradable plastics and coatings made from poly (lactic) acid, have the potential to greatly expand the market of lactic acid production (Cheng *et al.*, 1991; Gonçalves *et al.*, 1992). Up to date, approximately 90% of lactic acid has been produced by microbial fermentation, while the remainder is manufactured by chemical synthesis (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000). But products obtained by biological fermentation must be cost competitive with respect to chemical synthesis. Lactic acid production requires a complex basal medium which results in increasing production cost. The efficiency and economics of the lactic acid fermentation is still a problem from several points of view and medium composition plays a vital role in the

improvement of lactic acid production (Aeschlimann and von Stockar, 1990; Arasaratnan *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1991; Heriban *et al.*, 1993; Hujanen and Linko, 1996; Monteagudo *et al.*, 1993). Current research efforts focus on looking for effective nutritional sources and new fermentation techniques. It has been suggested that for lactic acid production, economical and industrial media should be investigated to reduce related costs.

As mentioned earlier (Nancib *et al.*, 1997), Algeria produces different varieties of dates with an annual production of over 300 000 tons. However, about 20 % of the production is lost due to over-ripening and improper handling, processing, and marketing. Utilization of poor-quality dates and date by-products in bakery and ice-cream products, in the production of caramel color, alcohol, vinegar, single-cell protein (Mehaia, 1991), oxytetracycline (Abou-Zeid *et al.*, 1993), baker's yeast (Jalaluddin *et al.*, 1995; Nancib *et al.*, 1997), and lactic acid (Nancib *et al.*, 2001) has been studied. Dates contain large amounts of sugars, especially glucose, fructose and sucrose at levels of 68-81 % (dry basis). Dates also contain protein, lipid, fibre, mineral elements and some vitamins (Abou-Zeid *et al.*, 1991) thus making date extracts quite suitable as feedstock for fermentation.

Many mathematical models have been reported to describe the kinetics of cell growth and lactic acid production in lactic acid fermentation and have proven to accurately describe lactic acid fermentation in a wide range of experimental conditions and media (Rogers *et al.*, 1978; Yeh *et al.*, 1991; Kumar Dutta *et al.*, 1996; Moneagudo *et al.*, 1997; Tango et Ghay, 1999; Amrane et Prigent, 1999; Ben Youcef *et al.*, 2000; Boonmee *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2006). However, there are only a few models which represent the utilization of multiple substrates in complex media and particularly the simultaneous consumption of substrates (Doshi and Venkatesh, 1998; Jyoti *et al.*, 2003).

In this study, an attempt has been made to use kinetic model to describe the cell growth, the simultaneous utilization of glucose and fructose and the lactic acid production in batch fermentation of *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on date juice medium.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and growth conditions

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* NRRL-B445, a homofermentative lactic acid producer, was used. Stock cultures were stored in MRS medium with 25 % (v/v) glycerol at – 20°C. The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture to

Erlenmeyer flasks containing 100 ml of liquid MRS medium for preculture. The flask was subsequently incubated at 38°C for 12 h, the time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase. Then, the culture was inoculated to fermentor containing the production medium. A 10% inoculum grown in the MRS medium was used in all fermentation.

2.2. Date juice extract

The method used was adapted from Nancib et al. (1999). The dates were thoroughly cleaned manually to remove dust and foreign materials. The seeds were separated by manual splitting. Tap water added at a ratio of two parts of water to one part of dates (by weight). The mixture was heated at 80°C for 2h with continuous stirring. The mixture was centrifuged at 20,000 g for 10 min to separate the cellulosic debris, while the supernatant was essentially as the carbon source in the fermentation medium. Immediately prior to each experiment, an appropriate quantity of date juice was diluted to the desired concentration of sugars. Sugars content of the collected supernatant solution consisted of glucose and fructose.

2.3. Production medium

The production medium consisted of yeast extract, 10 g.l⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g.l⁻¹; MnSO₄.H₂O, 0.03 g.l⁻¹; KH₂PO₄, 3 g.l⁻¹; K₂HPO₄, 3 g.l⁻¹; sodium acetate, 2 g.l⁻¹; Tween 80, 1 ml/l. The two different sugars constituting the date juice (glucose and fructose) were tested in at different initial concentrations.

2.4. Batch fermentation

A series of batch fermentations was performed using date juice sugars with different initial concentrations of glucose and fructose. All fermentations were carried out in a 2 l stirred tank fermentor (Biolaphite) with a working volume of 1 l, using 10% (v/v) inoculum. During the experiments, temperature and agitation rate were controlled at 38°C and 200 rpm. The pH was maintained at 6 by automatic addition of 5N NH₄OH solution. The bacterial, date juice sugars (glucose and fructose) and lactic acid concentrations were following during the course of the fermentation.

2.5. Analytical methods

Biomass concentration was estimated by optical measurement at 620 nm and calibrated to the cell dry weight. Concentrations of lactic acid, glucose and fructose were determined by a high-performance liquid chromatography equipped with an RI, UV detector (Waters, USA). The column used was a Polypore H (250 x 7 mm) (Bronnlee labs, USA) operated at 65°C using 0.04N H₂SO₄ as eluant at a flow rate of 0.9 ml/min.

3. Model development

The model of lactic acid production used in the study was based on a modified Luedeking-Piret model. The modified model accounts for lactic acid production associated to growth only. This model was then further developed to include terms for substrates (glucose and fructose) limitation on the cell growth and cell death. The model is used to describe the cell growth, simultaneous utilization of mixture of two substrates (glucose and fructose) and product formation during batch fermentations of *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* in date juice medium.

3.1. Cell growth and cell death

The specific growth rate of microorganisms is usually described by a Monod-type relationship:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

where $\mu_{\max}$ is the maximal specific growth rate, S is the substrate concentration, and K_S the saturation constant

In our study, two species are considered: the first one is assumed to grow on glucose and is referred with subscript G and the second one is assumed to grow on fructose and is referred with subscript F.

Two specific growth rates μ_G and μ_F are thus introduced.

$$\mu_G = \mu_{\max G} \frac{G}{K_G + G} \quad (2)$$

$$\mu_F = \mu_{\max F} \frac{F}{K_F + F} \quad (3)$$

where:

- μ_G : is the specific growth rate on glucose (h⁻¹)
- μ_F : is the specific growth rate on fructose (h⁻¹)
- K_G : is the glucose saturation constant (g.l⁻¹)

G : is the glucose concentration (g.l^{-1})

$\mu_{\max G}$: is the maximum specific growth rate on glucose (h^{-1})

K_F : is the fructose saturation constant (g.l^{-1})

F : is the fructose concentration (g.l^{-1})

$\mu_{\max F}$: is the maximum specific growth rate on fructose (h^{-1})

In this study, cell death is considered and introduced using a simple first order model.

two specific cell death rates r''_{dG} and r''_{dF} are introduced:

$$r''_{dG} = k_{dG} X_G \quad (4)$$

$$r''_{dF} = k_{dF} X_F \quad (5)$$

where:

k_{dG} is the specific cell death rate of the biomass growing on glucose (h^{-1})

k_{dF} is the specific cell death rate of the biomass growing on fructose (h^{-1})

The mass balance for each species can be described as follows:

$$\text{Net Cell Growth Rate} = \text{Cell Growth Rate} - \text{Cell Death Rate} \quad (6)$$

Using the introduced notation, equation (6) can be written as follows:

$$\frac{dX_G}{dt} = \mu_G X_G - r''_{dG} \quad (7)$$

$$\frac{dX_F}{dt} = \mu_F X_F - r''_{dF} \quad (8)$$

The mass balance for the global biomass concentration thus yields:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dX_G}{dt} + \frac{dX_F}{dt} = \mu_G X_G - r''_{dG} + \mu_F X_F - r''_{dF} \quad (9)$$

3.2. Substrates (glucose and fructose) utilization

The specific rate of substrates utilization (glucose and fructose) is the sum of two terms representing the following two processes: the biosynthesis of product and the growth of microbial cells. This relationship can be mathematically expressed by the following equations:

$$\frac{dG}{dt} = -(r_{GX}''' + r_{GP}''') \quad (10)$$

$$\frac{dF}{dt} = -(r_{FX}''' + r_{FP}''') \quad (11)$$

with:

r_{GX}''' : the rate of glucose uptake for cell growth ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_{GP}''' : the rate of glucose uptake for product formation ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_{FX}''' : the rate of fructose uptake for cell growth ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_{FP}''' : the rate of fructose uptake for product formation ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

The rate of substrate uptake for cell growth and the rate of substrate uptake for product formation can be described by the following expressions:

$$\begin{aligned} r_{GX}''' &= \frac{\mu_G X}{Y_{X/G}} & r_{GP}''' &= \frac{r_{PG}'''}{Y_{P/G}} \\ r_{FX}''' &= \frac{\mu_F X}{Y_{X/F}} & r_{FP}''' &= \frac{r_{PF}'''}{Y_{P/F}} \end{aligned}$$

where:

$Y_{P/G}$: is the yield coefficient for product on glucose (g.g^{-1})

$Y_{X/G}$: is the yield coefficient for cell on glucose (g.g^{-1})

$Y_{P/F}$: is the yield coefficient for product on fructose (g.g^{-1})

$Y_{X/F}$: is the yield coefficient for cell on fructose (g.g^{-1})

r_{PG}''' : is the lactic acid production rate from glucose ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

r_{PF}''' : is the lactic acid production rate from fructose ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

In this study, all yields are assumed to be constant.

Equations (10) and (11) can be developed as follows:

$$\frac{dG}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/G}} \mu_G X_G + \frac{r_{PG}'''}{Y_{P/G}} \right] \quad (12)$$

$$\frac{dF}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/F}} \mu_F X_F + \frac{r_{PF}'''}{Y_{P/F}} \right] \quad (13)$$

The substrates utilization rate by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* can be described as follows:

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/G}} \mu_G X_G + \frac{r_{PG}'''}{Y_{P/G}} \right] - \left[\frac{1}{Y_{X/F}} \mu_F X_F + \frac{r_{PF}'''}{Y_{P/F}} \right] \quad (14)$$

3.3. Product (lactic acid) production

The lactic acid production rate can be described by the Luedeking-Piret model (1959):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha (\mu X) + \beta X \quad (15)$$

In this study, production non associated to biomass concentration is neglected ($\beta=0$):

The lactic acid production rates are thus described by:

$$\frac{dP_G}{dt} = \alpha_G (\mu_G X_G) \quad (16)$$

$$\frac{dP_F}{dt} = \alpha_F (\mu_F X_F) \quad (17)$$

where:

α_G : the energy coefficient for growth on glucose (h^{-1})

α_F : the energy coefficient for growth on fructose (h^{-1})

The above two coefficients can be defined as follows:

$$\alpha_G = \frac{Y_{P/G}}{Y_{X/G}} \quad (18)$$

$$\alpha_F = \frac{Y_{P/F}}{Y_{X/F}} \quad (19)$$

The rate at which the product is accumulated in the reactor is expressed by the following relationship:

$$\frac{dP}{dt} = \left[X_G \left[\alpha_G \left(\mu_{\max G} \frac{G}{K_G + G} \right) \right] + X_F \left[\alpha_F \left(\mu_{\max F} \frac{F}{K_F + F} \right) \right] \right] \quad (20)$$

The kinetic model of Glucose and Fructose consumption by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* to produce lactic acid is thus given by:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_G - k_{dG})X_G + (\mu_F - k_{dF})X_F \quad (21)$$

$$\frac{dG}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/G}} \mu_G X_G + \frac{\alpha_G (\mu_G X_G)}{Y_{P/G}} \right] \quad (22)$$

$$\frac{dF}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{X/F}} \mu_F X_F + \frac{\alpha_F (\mu_F X_F)}{Y_{P/F}} \right] \quad (23)$$

$$\frac{dP}{dt} = \alpha_G (\mu_G X_G) + \alpha_F (\mu_F X_F) \quad (24)$$

With $\mu_G = \mu_{\max G} \frac{G}{K_G + S}$ and $\mu_F = \mu_{\max F} \frac{F}{K_F + S}$

4. Model identification

The differential equations were solved, and the parameters were identified using the software MATLAB by minimizing quadratic residuals between the experimental and predicted data using the objective function shown in Eq. 25. The Nelder & Mead search method was used in the optimization procedure (Nelder and Mead, 1965). The values of the model parameters presented in Table 1 were used to test the quality of the model. The theoretical transient response of the concentrations was predicted by solving Equations (21-24) using the fourth-order Runge-Kutta numerical integration method.

$$J = \sum_i \omega_i \left(\sum_j (x_{ij}^{\exp} - x_{ij}^{\text{mod}})^2 \right) \quad (25)$$

In which i is the index related to the concentration type (X, G, F or P); j is the index related to measurement time; and *exp* and *mod* refers to experimental and model data, respectively.

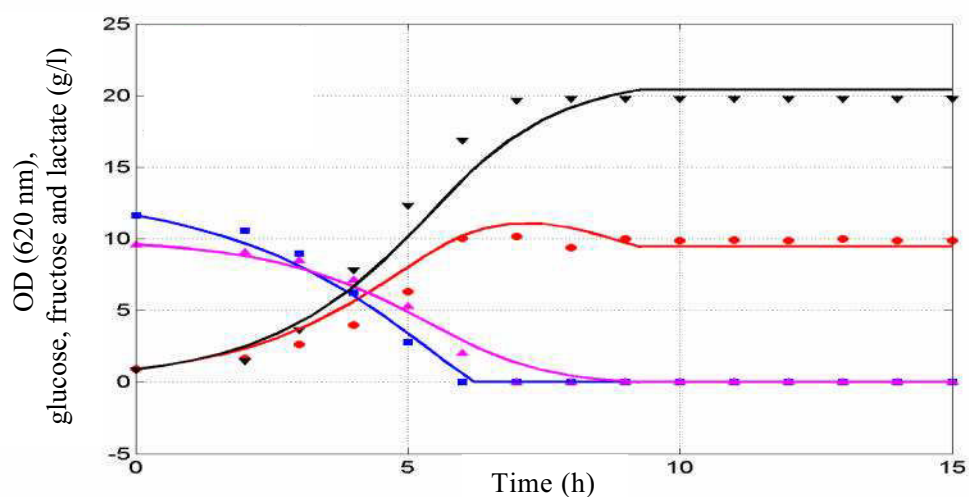
Figure 1 (a,b,c) and Figure 2 (d,e,f) show the predicted and experimental results of cell, substrates and lactic acid production at different initial substrates concentrations. The experimental data are represented by symbols, while the predicted data are represented by a line.

In a batch culture with low initial substrates concentration, growth, sugars, and lactic acid concentrations were accurately predicted by the model (Figure 1(a,b,c)).

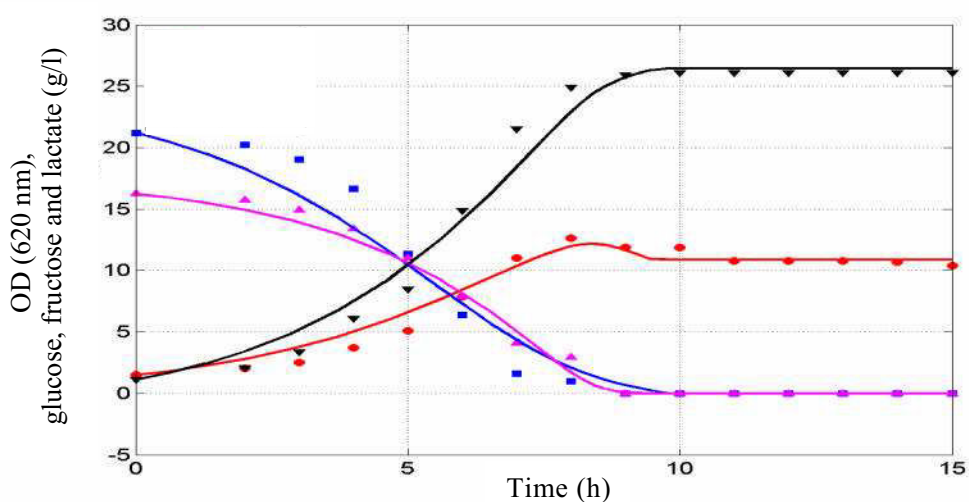
In a batch culture with higher initial substrates concentration, the predicted growth, sugars and lactic acid concentration agreed well with the observed values during the first 15 hours then a decoupling of the experimental results and simulation is observed (Figure 2 (d,e,f)).

Table 1. Kinetic parameters

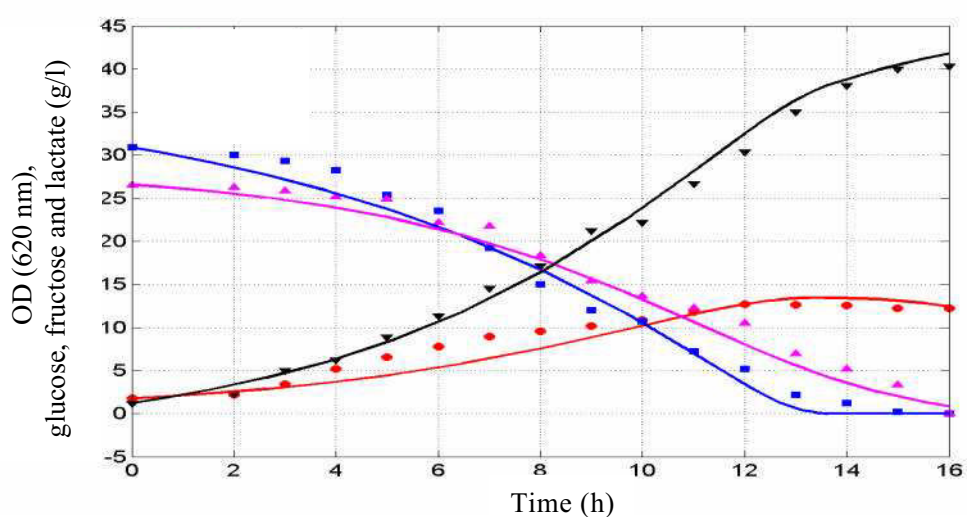
Parameters (unit)	Initial glucose (G) and fructose (F) concentration (g.l ⁻¹)					
	G:11.62 F:9.60	G:21.2 F:16.2	G:30.9 F:26.5	G:40.7 F:35.7	G:51.2 F:45.2	G:61.5 F:48.4
$\mu_{\max G}$ (h ⁻¹)	0.52	0.58	0.19	0.31	0.28	0.78
K_G (g.l ⁻¹)	4.41	14.03	1.45	10.98	5.78	18.08
$Y_{X/G}$ (g.g ⁻¹)	1.9	0.21	0.15	0.21	0.22	2.6
$\mu_{\max F}$ (h ⁻¹)	1.35	0.60	0.55	0.29	1.11	0.13
K_F (g.l ⁻¹)	7.91	1.28	14.54	5.77	35.78	2.28
$Y_{X/F}$ (g.g ⁻¹)	1.58	0.5	1.28	0.15	0.59	1.35
$Y_{P/G}$ (g.g ⁻¹)	0.11	0.71	1.01	16.38	92.14	0.63
$Y_{P/F}$ (g.g ⁻¹)	3.51	9.69	1.30	16.63	2.07	0.90
α_G (g.g ⁻¹)	0.10	1.03	2.69	1.51	0.97	0.22
α_F (g.g ⁻¹)	1.01	0.98	0.92	3.30	1.38	2.19
k_{dG} (h ⁻¹)	0.02	0.04	0.05	0.00	0.02	0.39
k_{dF} (h ⁻¹)	0.17	0.23	0.12	0.18	0.47	0.02



(a) : initial glucose concentration : 11.62 g/l ; initial fructose concentration : 9.60 g/l

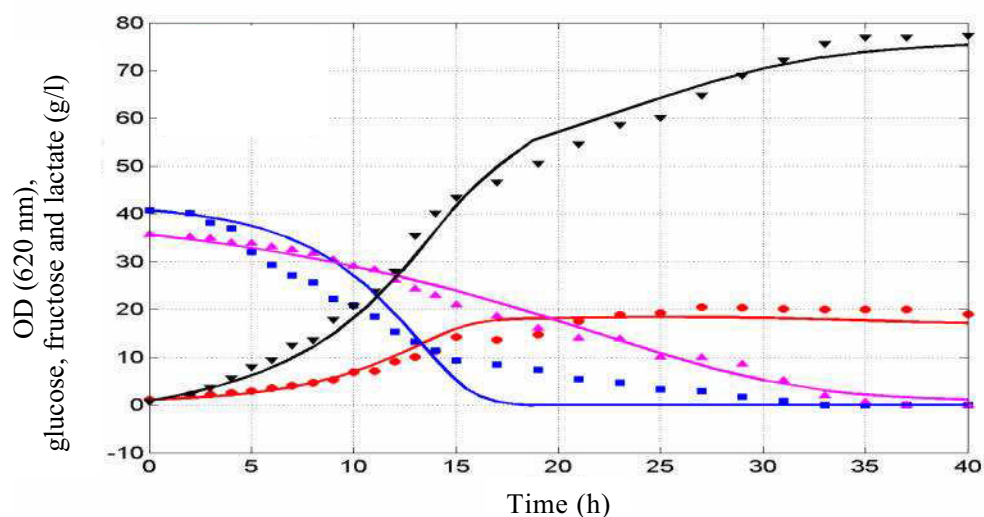


(b) : initial glucose concentration : 21.20 g/l ; initial fructose concentration : 16.25 g/l

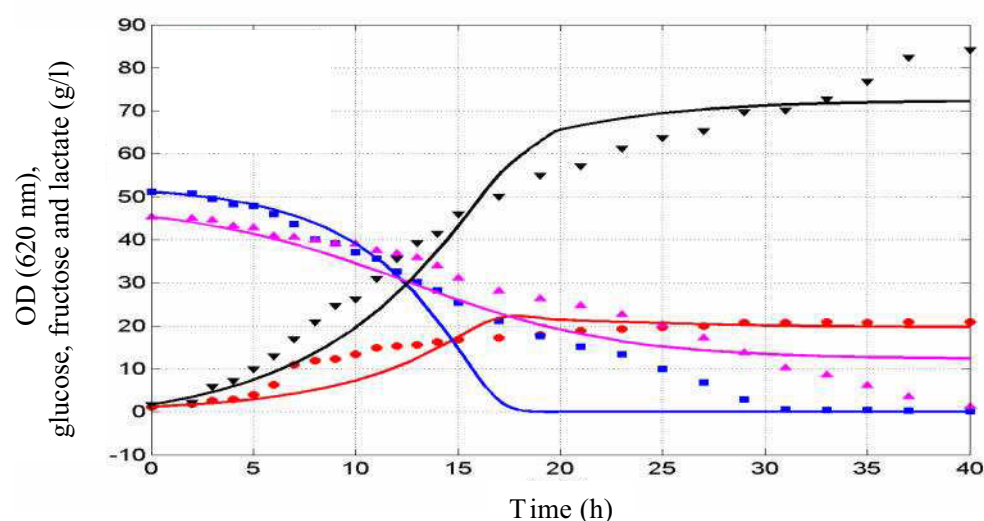


(c) : initial glucose concentration : 30.9 g/l ; initial fructose concentration : 26.57 g/l

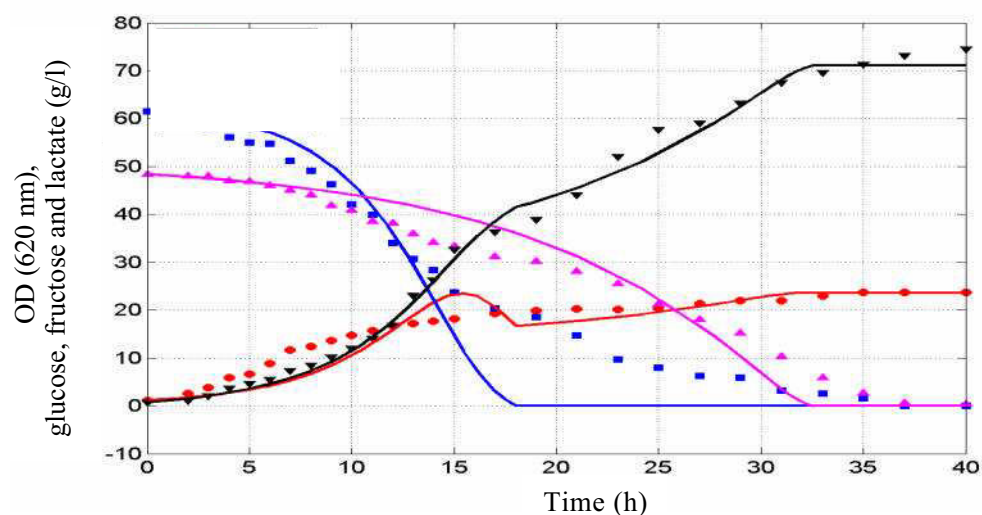
Figure 1 (a,b,c). Simulation of batch fermentation conversion of glucose and fructose to lactic acid and cells using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* on date juice medium. Experimental data (symbols) and model predictions (lines): (●) OD; (■) glucose; (▲) fructose; (▼) lactate.



(d) : initial glucose concentration : 40.73 g/l ; initial fructose concentration : 35.71 g/l



(e) : initial glucose concentration : 51.17 g/l ; initial fructose concentration : 45.36 g/l



(f) : initial glucose concentration : 61.54 g/l ; initial fructose concentration : 48.41 g/l

Figure 2 (d,e,f). Simulation of batch fermentation conversion of glucose and fructose to lactic acid and cells using *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* on date juice medium. Experimental data (symbols) and model predictions (lines): (●) OD; (■) glucose; (▲) fructose; (▼) lactate

5. Conclusion

A kinetic model for lactic acid batch fermentation was developed. The model used in the study was based on a modified Luedeking-Piret model. The used model accounted for substrates limitation, cell death and relates lactic acid production to cell growth. To model the dynamic state of the batch fermentation four equations that represent growth, substrates utilization and lactic acid production have been proposed.

The model has been tested for a large range of glucose and fructose initial concentrations. For low initial substrates concentrations the model successfully predicts growth, sugars and lactic acid concentrations. The identified parameters are not identical but the order of magnitude seems acceptable and the values remain in the same decade. For high initial substrates concentrations, the model has been found to provide an adequate description of the fermentation kinetics during the first 15 hours. However, the model is not satisfactory on the remainder of fermentation. This model is not satisfactory and needs to be improved.

References

- Abou-Zeid, A.A., Abdelrhaman, N., Baghlaf, A.O., 1993. Use of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. Biosci. Biotechnol. Biochem., **57**, (6), 987-988.
- Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A., Baghlaf, A.O., 1991. The formation of oxytetracycline in date-coat medium. Biores. Techn. **37**, 179-184.
- Aeschlimann, A., von Stockar, V., 1990. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeable by *Lactobacillus helveticus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**, 398-402.
- Amrane, A., Prigent, Y., 1999. Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. Process Biochemistry, **34**, 1-10.
- Arasaratnan, V., Senthuran, A., Balasubaramaniam, K., 1996. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Enzyme Microb. Technol. **19**, 482-486.
- Ben Youssef, C., Guillou, V., Olmos-Dichara, A., 2000. Modelling and adaptive control strategy in a lactic fermentation process. Control Engineering Practice, **8**, 1227-1307.
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., Rogers, P.L., 2003. Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. Biochemical Engineering Journal, **14**, 127-135.

Cheng, P., Muller, R.E., Jaeger, S., Bajpai, R., Iannotti, E.L., 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. J. Ind. Microbiol. **7**, 27-34.

Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., Frank, J.R., 1995. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS. Microbiol. Rev. **16**, 221-231.

Doshi, P. and Venkatesh, K.V., 1998. An optimal model for microbial growth in multiple substrate environment: simultaneous and sequential utilization. Process Biochem., **33**, 663-670.

Goncalves, L.M.D., Barreto, M.T.O., Xavier, A.M.B., Carrondo, M.J.T., Klein, J., 1992. Insert supports for lactic acid fermentation a technological assessment. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**, 305-311.

Kumar Dutta, S., Mukherjee, A., Chakraborty, P., 1996. Effect of product inhibition on lactic acid fermentation : simulation and modelling. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**, 410-413.

Heriban, V., Stikey, V., Sturdik, E., Matus, P., 1993. Nutrition and broth alteration in the lactic acid fermentation. Acta Biotechnol. **35**(3), 283-288.

Hofvendahl, K et B. Hahn-Hägerdal (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology, **26**, 2, 87-107

Hujanen, M., Linko, Y.Y., 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources of L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **45**, 307-313.

Jalaluddin, A., Abulnaja, K.O., T.A., Abou-Zeid, A.A., 1995. Utilization of Saudi date sugars in production of baker's yeast. Biores. Technol. **53**, 63-66.

Lan, C.Q., Oddone, G., Mills, D.A., Block, D.E., 2006. Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and anaerobic conditions in the presence or absence of Hemin. Biotechnol. Bioeng. **95** (6), 1070-1080.

Leudeking, R. and Piret, E.L., 1959. A kinetic study of lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. **1**, 393-412.

Mehaia, M.M., 1991. Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors. Enzyme Microb. Technol. **13**, 257-261.

Mercier, P., Yerushalmi, L., Rouleau, D., Dochain, D., 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and com by *Lactobacillus amylophilus*. J. Chem. Technol. Biotechnol. **55**, 111-121.

Monteagudo, Rodriguez, L., Rinco, J.M., Fuertes, J., 1997. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. J. Chem. Tech. Biotechnol. **68**, 271-276.

Monteagudo, J.M., Rinco, J., Rodriguez, L., Fuertes, J., Moya, A., 1993. Determination of the best nutrient medium for the production of L-lactic acid from best molasses a statistical approach. *Acta Biotechnol.* **13**, 103-110.

Nancib, N., Nancib, A., Boudrant, J., 1997. Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.* **60**, 67-71.

Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., Boudrant, J., 2001. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Biores. Technol.* **78**, 149-153.

Nelder, J.A. and Mead, R., 1965. A simplex method for fuction minimization. *Computer Journal*, **7**, 308-313.

Pajpai-Dikshit, J., Suresh, A.K., and Venkatesh, K.V., 2003. An optimal model for representing the kinetics of growth and product formation by *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *J. Bioscience and Bioeng.* **96**, 5, 481-486.

Rogers, P.L., Bramall, L., McDonald, I.J., 1978. Kinetic analysis of batch and continuous culture of *Streptococcus cremoris* HP, *Can. J. Microbiol.* **24** (4), 372-380.

Tango, M.S.A., and Ghaly, A.E., 1999. Kinetics of batch production of lactic acid from cheese whey. *Trans, ASAE.* **42** (6), 1791-1800.

Yeh, P.L.H., Bajpai, R.K., Iannotti, E.L., 1991. An improved model for lactic acid fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 75-77.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail était de mettre au point un procédé relativement ou le plus performant possible de production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* à partir du jus de datte. Les résultats expérimentaux suggèrent que l'initiative à envisager une production d'acide lactique à partir de dattes, pourrait s'avérer pertinente, et devrait peut-être encouragée, notamment au niveau des études complémentaires à faire. Il ne faut en effet pas perdre de vue que la matière première utilisée est un déchet. L'objectif visé à atteindre est la récupération et la valorisation de ces déchets sous une forme économiquement utile. Cela dit un des problèmes restant à analyser et évaluer est entre autres celui du rassemblement et du transport de tous ces déchets.

Les principaux résultats obtenus au cours de notre travail sont indiqués ci-dessous. Le travail expérimental a été scindé en quatre chapitres.

I. Cultures discontinues

Dans une première partie, des cultures en mode discontinu ont été réalisées afin d'optimiser la composition du milieu de culture et, d'étudier les besoins nutritionnels de la souche bactérienne utilisée. Ces études avaient pour objet de décrire les effets des sources carbonées et azotées sur la croissance et la production d'acide lactique.

Le jus de datte en tant que source de carbone, peut être utilisé à une concentration de 50 g/l. Cependant, le jus de datte seul est pauvre en source azotée en regard des besoins de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Pour pallier cela, différents enrichissements en sources d'azotes ont été proposés: extrait de levure, tryptone de soja, sulfate d'ammonium, peptone, hydrolysate de caséine et urée. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace. Les autres sources sont des substituants possibles de l'extrait de levure particulièrement le sulfate d'ammonium. Ce dernier permet de minimiser les coûts liés à l'ajout du co-substrat, mais reste moins efficace que l'extrait de levure.

L'efficacité de l'extrait de levure est due probablement à sa richesse en vitamines B. Pour cette raison, un complexe de vitamines du groupe B (acide folique, riboflavine, pantothénate, pyridoxine, niacine) a été supplémenté aux différentes sources azotées. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de vitamines apporte une nette amélioration de la production d'acide lactique avec le sulfate d'ammonium, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec l'utilisation partielle de l'extrait de levure (5 g/l) combinée avec le sulfate d'ammonium (2,5 g/l) plus les vitamines du groupe B (25 mg/l).

Dans une deuxième partie, un système de cultures pures et mixtes de *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sur jus de datte a été étudié.

Les résultats obtenus ont montré que le système de culture mixte donne de meilleurs résultats concernant la production d'acide lactique et l'utilisation des sucres comparés à ceux obtenus en cultures pures de *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis*. En effet, le maximum de production d'acide lactique (60 g/l) est obtenue en culture mixte alors que durant les cultures pures de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, les concentrations en acide lactique sont respectivement 53 et 46 g/l. Les pourcentages d'utilisation du glucose et du fructose avec *Lb. casei* pure sont respectivement 82% et 94% et ceux correspondant à *Lc. lactis* pure sont respectivement 94% et 60%. Dans le cas de culture mixte, les pourcentages d'utilisation du glucose et du fructose sont respectivement 96% et 100%.

Ainsi, le système de culture mixte permet d'obtenir une meilleure production d'acide lactique et une meilleure consommation de sucres par rapport à celles obtenues en cultures pures.

Dans une troisième partie, l'effet des sucres purs (glucose et fructose) et mixtes (glucose/fructose) a été étudié sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. L'effet des sucres de jus de datte en tant que source de carbone a également été étudié sur la production d'acide lactique.

Les résultats obtenus ont montré que lorsque *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* pousse séparément sur glucose (100 g/l) et fructose (100 g/l), le comportement de croissance et de production d'acide lactique sont similaires. La meilleure productivité volumétrique a été obtenue dans le milieu contenant du glucose avec une meilleure utilisation de substrat (43,38%). La productivité volumétrique, le rendement de production d'acide lactique à partir de glucose et la concentration finale en acide lactique sont respectivement 0,78 g/l/h, 0,38 g/g et 18,85 g/l.

Le fructose peut être également utilisé en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique. La productivité volumétrique, le rendement de production d'acide lactique à partir de fructose et la concentration d'acide lactique finale sont respectivement 0,59 g/l/h, 0,3 g/g et 14,24 g/l.

En présence d'un mélange de glucose (50 g/l) et de fructose (50 g/l), *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* co-métabolise les deux sucres. La productivité volumétrique (0,89 g/l.h) est supérieure à celles obtenues sur les sucres purs.

Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un milieu contenant les sucres de jus de datte (glucose/fructose). La productivité volumétrique et la concentration finale en acide lactique sont respectivement 1 g/l/h et 23,75 g/l.

Donc, la production d'acide lactique est plus importante sur sucres mixtes que sur sucres purs ce qui explique les performances de fermentation sur jus de datte. De plus, le jus de datte ne contient pas uniquement un mélange de sucres, mais contient également des protéines, des éléments minéraux et des vitamines ce qui a permis probablement d'améliorer la production d'acide lactique.

II. Cultures semi-continues

Cette partie a été consacrée à l'amélioration des performances du procédé de production d'acide lactique en réacteur semi-continu, en termes de productivité volumétrique et de concentrations finales en acide lactique.

Les deux principales variables influençant le bon fonctionnement du procédé sont le débit et la concentration du milieu d'alimentation. Deux concentrations d'alimentation (62 g/l et 100 g/l de glucose de jus de datte) ont été testées à des débits variables (150, 75, 33, 22 et 18 ml/h).

Les meilleurs résultats sont obtenus avec un débit de 33 ml/h et une concentration de 62 g/l de glucose de jus de datte dans l'alimentation. Ceci a permis d'avoir la plus forte productivité (1,3 g/l.h), le rendement le plus élevé $Y_{p/s}$ (1,7) et une meilleure production en acide lactique (89,2 g/l).

III. Cultures continues

Le premier objectif de cette partie était d'utiliser l'extrait bactérien en culture batch comme étant une alternative économique par rapport à l'extrait de levure en tant que source d'azote relativement onéreuse. Le second objectif était d'évaluer les effets de différents taux de dilution en culture continue sur la croissance et la production d'acide lactique. Ceci nous permettra d'étudier le comportement de la souche dans ce mode de culture puis déterminer le taux de dilution optimal afin d'améliorer les performances de production d'acide lactique.

En mode batch, les résultats obtenus ont montré que 1% d'extrait de levure pourrait être substitué par 3% d'extrait bactérien et des vitamines du groupe B. Dans ces conditions, la concentration de production d'acide lactique et la productivité volumétrique de production sont respectivement 80,4 g.l⁻¹ et 2 g.l⁻¹.h⁻¹.

En mode continu, les résultats obtenus ont montré qu'il existe deux zones de taux de dilution: une productivité maximale (3,8 g.l⁻¹.h⁻¹) est atteinte au plus fort taux de dilution (0,07 h⁻¹) et un maximum d'acide lactique (96,4 g.l⁻¹) est obtenu à un taux de dilution de 0,033 h⁻¹. De plus, l'enrichissement du milieu d'alimentation en source azotée et en sels permet d'améliorer la production d'acide lactique (104,3 g.l⁻¹).

Finalement, l'extrait bactérien de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* semble une bonne alternative économique en tant que source d'azote. La culture en mode continu est un procédé intéressant pour la production de ce métabolite. L'enrichissement du milieu d'alimentation permet d'améliorer les performances de la fermentation.

IV. Modélisation

Dans cette dernière partie, nous avons proposé un modèle mathématique intégrant les principales données cinétiques accumulées durant la fermentation en réacteur discontinu à différentes concentrations initiales en sucres de jus de datte. Le modèle a été élaboré dans un souci de simplicité tout en considérant les principaux phénomènes observés. Le modèle développé permet de simuler assez bien les évolutions des concentrations en biomasse, sucres de datte (glucose et fructose) et acide lactique lorsque les expériences sont traitées individuellement. Cependant, les résultats ne sont pas satisfaisants, car les paramètres cinétiques sont différents d'une concentration à une autre. Il manque donc quelque chose d'important dans le modèle, et ceci devra être approfondi.

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

Les principales sont les suivantes :

- Il serait intéressant d'expliquer le phénomène de non utilisation du saccharose présent dans le jus et d'identifier les facteurs qui régulent le métabolisme et le transport de ce dernier. Ceci constitue un intérêt économique important et non

négligeable car il s'agit d'un « manque à gagner » c'est-à-dire un gaspillage de substrat.

- Une hydrolyse du saccharose du jus de datte par voie enzymatique (invertase) est envisageable. Ceci permettrait une consommation complète des sucres de datte et une amélioration des procédés de production d'acide lactique.
- Suite aux analyses chimiques de l'hydrolysât de noyaux de dattes qui ont révélé la présence de 16 acides aminés (Abou-Zeid et Khoja, 1993), il serait intéressant de les valoriser en les utilisant en tant que source azotée pour la production d'acide lactique.
- Réaliser des analyses complémentaires concernant les métabolites secondaires produits tels que l'acétate et l'éthanol pour éclaircir les voies métaboliques qui pourraient être empruntées par la souche lors des cultures semi-continues.
- L'immobilisation des bactéries lactiques dans des polymères ou fixées sur des supports de différents types. Ceci pourrait augmenter la productivité. Il pourrait être intéressant de produire l'acide lactique à partir de jus de datte en utilisant des cellules immobilisées de *Lactobacillus casei* par inclusion dans une matrice de polymères. Le K-carraghénane et l'alginate, sont préférentiellement choisis pour leur disponibilité, biocompatibilité, coût, propriétés mécaniques et surtout leur non toxicité.
- Dans le cadre d'un développement ultérieur de ce travail, les recherches devraient s'orienter dans le sens d'un affinement du modèle et dans celui de son utilisation pour la conduite optimale de la fermentation. Le modèle peut être amélioré par une meilleure connaissance des phénomènes observés. Ensuite les recherches devraient se poursuivre dans le sens d'une généralisation du modèle et de son application au mode de conduite de la fermentation en semi-continu et continu.
- L'étude d'une voie de purification: la cristallisation de l'acide lactique sous la forme de lactate de calcium peut être envisagée en tenant compte des impératifs économiques et techniques des industriels.

Références bibliographiques

Abou-Zeid, A.A., N.A. Baeskin et A.O. Baghlaf (1993). Utilisation of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **58**, 77-79

Abou-Zeid, A.A. et S.M. Khoja (1993). Utilisation of dates in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Zentralblatt für Mikrobiologie, **148**, 213-221

Abou-Zeid, A.A., A. Nabeh et O. Baghlaf (1991). The formation of oxytetracycline in a date coat medium. Bioresource Technology, **37**, 179-184

Ahmed, I.S.A., K.N. El-Gharibi, A.S. Daar et S. Kabir (1995). The composition and properties of date proteins. Food Chemistry, **53**, 441-446

Akerberg, C., K. Hofvendahl, G. Zacchi, B. Hahn-Hägerdal (1998). Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentration on the kinetic of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole wheat flour. Applied Microbiology and Biotechnology, **49**, 682-690

Akerberg, C. et G. Zacchi (2000). An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. Bioresource Technology, **75**, 119-126

Alemzadeh, I. et M. Vosoughi (2002). Date syrup and baker's yeast production. Industrial Engineering Chemistry Research, **41**, 128-130

Al Bassam, R. (2001). Industrial ethanol production using juice of dates in a fixed cell process. Second International Conference on Date Palms, Al Ain. U.A.E March 25-27, 850-860.

Alma, L. (1982). Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. Journal of Dairy Science, **65**, 4, 515-520

Al-Obaidi, Z.S., D.R. Berry (1979). The use of deionised date syrup as a substrate for citric acid fermentation. Biotechnology Letters, **1**, 153-158

Altioik, D., F. Tokalti et S. Hersa (2006). Kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **81**, 1190-1197

Amrane, A. (2005). Analysis of the kinetics of growth and lactic acid production for *Lactobacillus helveticus* growing on supplemented whey permeate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **80**, 345-352

Amrane, A et C. Couriol (2002). Batch cultures of *L. helveticus* growing on supplemented whey permeate : unstructured model for seed cultures without pH control. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **77**, 950-957

Amrane, A. (2001). Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. Enzyme and Microbial Technology, **28**, 827-834

Amrane, A., Y. Prigent (1996). A novel concept of bioreactor: Specialized function two stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid. *Journal of Biotechnology*, **45**, 195-203

Amrane, A., Y. Prigent (1998). Lactic acid production during the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. *Biotechnology Letters*, **20**, 379-383

Amrane, A., Y. Prigent (1999a). Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **74**, 33-40

Amrane, A., Y. Prigent (1999b). Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model. *Process Biochemistry*, **34**, 1-10

Amouzou, K.S., H. Prevost et C. Divies (1985). Influence de la supplémentation du lait en magnésium sur la fermentation lactique réalisée par *Streptococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, **65**, 21-34

Anders, R.F., H.A. Jonas et G.R. Jago (1970). A survey of the lactate dehydrogenase activities in group N streptococci. *Australian Journal of Dairy Technology*, **19**, 73-76

Anonyme (1994). Statistiques agricoles Série A. 1966 à 1993. Ministère de l'Agriculture

Arasaratnam, V., A. Senthuran, K. Balasubramaniam. (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 482-486

Archibeld, F.S. (1986). Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, **13**, 63-109

Auda, H., El-wandawi et L. Al Adhami. (1976). Protein and amino acid composition of three varieties of iraqi dates at different stages of development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **24**, 365-367

Bâati, L., G. Roux, B. Dahhou et J.L. Uribe Larrea (2004). Unstructured modelling growth of *Lactobacillus acidophilus* as a function of the temperature. *Mathematics and Computers in Simulation*, **65**, 137-145

Bai, D.M., Q. Wee, Z.H. Yan, X.M. Zhao, X.G. Li et S.M. Xu (2003). Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of lactic acid. *Biotechnology Letters*, **25**, 1833-1835

Balannec, B., A. Bouguettoucha et A. Amrane (2007). Unstructured model for batch cultures without pH control of *Lactobacillus helveticus*-Inhibitory effect of the undissociated lactic acid. *Biochemical Engineering Journal*. Article in press.

Béal, C. et G. Corrieu (1994). Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus 398 at the different steps of their production. Lebensmittel Wissenschaft. Technologie, **27**, 86-92

Bellengier, P., C. Foucaud et J. Richard (1997). Associative growth studies of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strain in milk. Journal of Dairy. Research, **80**, 1520-1527

Benjamin, N.D., H. Zoubair et W. Al Tai (1975). Zahdi date syrup. Third International Palm Dates Conferences, Baghdad, 30 Novembre

Ben Youssef, C., V. Guillou et A. Olmos-Dichara (2000). Modelling and adaptative control strategy in a lactic acid fermentation process. Control Engineering Praticce, **8**, 1297-1307

Bergmaier D, C.P. Champagne, C. Lacroix (2003). Exopolysaccharide production during batch cultures with free and immobilized *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M. Journal of Applied Microbiology, **95**, 1049-1057

Berry, A.R., C.M.M. Franco, W. Chang et A.P.J. Middelberg (1999). Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. Biotechnology Letters, **21**, 163-167

Biazar, J., M. Tango, E. Babolian et R. Islam (2003). Solution of the kinetic modelling of lactic acid fermentation using Adomian decomposition method. Applied Mathematics and Computation, **144**, 433-439

Bogaert, J.C. (1997). Production and novel application of natural L(+) lactic acid: food, pharmaceuitics and biodegradable polymers. Cerevisa, **22**, 46-50

Boquien, C.Y., G. Corrieu et M.J. Desmazeaud (1988). Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed culture. Applied and Environmental Microbiology, **54**, 2527-2531

Boughnou, N. (1988). Essai de production de vinaigre à partir de déchets de dattes. Thèse de Magister, INA Alger

Booij, I., G. Piombo, J.M. Risterucci, M. Coupe, D. Thomas et M. Ferry (1992). Etude de la composition chimique de la date à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Fruits, **47**, 667-677

Booij, I., G. Piombo, J.M. Risterucci, D. Thomas et M. Ferry (1993). Sugar and free amino acid composition of five cultivars of dates from offshoots or vitroplants in open field. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **41**, 1553-1557

Boonmee, M., N. Leksawasdi, W. Bridge et P.L. Rogers (2003). Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. Biochemical engineering journal, **14**, 127-135

- Boyaval, P. (1989).** Lactic acid bacteria and metal ions. *Le Lait*, **69**, 87-113
- Brink, B.T., konnings W.N (1982).** Electrochemical proton gradient and lactate concentration gradient in *Streptococcus cremoris* cells grown in batch culture. *Journal of Bacteriology*, **152**, 682-686
- Brink, B.T., R. Otto, U.P. Hansen, et W.N. Konings (1985).** Energy recycling by lactate efflux in growing and nongrowing cells of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, **162**, 383 -390.
- Bruhn, J.C et E.B. Collins (1970).** Reduced nicotiamide adenine dinucleotide oxidase of *Streptococcus diactylactis*. *Journal of Dairy Science*, **53**, 857-860
- Burgos-Rubio, C.N., M.R. Okos et P.C. Wankat (2000).** Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, **16**, 305-314
- Bustos, G., A.B. Moldes, J.M. Cruz et J.M. Dominguez (2004).** Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**, 2105-2112
- Buyukgungor, H. (1992).** Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa carragenan gels. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **53**, 173-175
- Büyükkilci, A.O. et S. Harsa (2004).** Batch production of L(+)-lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79**, 1036-1040
- Caplice, E. et G.F. Fitzgerald (1999).** Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, **50**, 131-149
- Cleveland, M.M. et C.R. Fellers (1932).** Mineral composition of dates. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition*, **4**, 267-268
- Cocaign-Bousquet, M., C. Garrigues, L. Novak, N.D. Lindley et P. Loubiere (1995).** Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, 108-116
- Cook, G.M. and J.B. Russell (1994).** The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology*, **28**, 165-168
- Cotton, J.C, A.L. Pometto III, J. Gvozdenovic-jeremic (2001).** Continuous lactic acid fermentation using plastic composite support biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**, 626-630
- Crow, V.L. et G.G. Pritchard (1976).** Purification and properties of pyruvate kinase from *Streptococcus lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **438**, 90-101

Crow, V.L. et G.G. Pritchard (1977). Fructose 1,6 diphosphate-activated L-lactate dehydrogenase from *Streptococcus lactis*; kinetic properties and factors affecting activation. *Journal of Bacteriology*, **131**, 1, 82-91

Czytko, M., K. Ishii et K. Kawai (1987). Continuous glucose fermentation for lactic acid production: recovery of acid by electrodialysis. *Chemie Ingenieur Technik*, **59**, 12, 952-954

Demirci, A. et A.L. Pometto (1992). Enhanced production of D(-) lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. *Journal of Industrial Microbiology*, **11**, 23-28

De Man, J.C., M. Rogosa, et E.M. Sharpe (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**, 130-135

De Roissart, H. et F.M. Luquet (1994). Les bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica-Uriage*, **1**, 605

Desmazeaud, M. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *Le Lait*, **63**, 286-310

Desmazeaud, M.J. et H. De Roissard (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques, Bactéries lactiques, aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Lorica-Uriage, **1**, 169-207

Desmazeaud, M. (1996). Quelques problèmes posés par le réensemencement des bactéries lactiques dans le lait industriel. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* **11**, 106-112

Desmazeaud, M. (1997). Principaux paramètres de l'écologie microbienne des produits laitiers fermentés. *Microbiologie Aliments Nutrition*, **15**, 99-114

Desmazeaud, M.J. (1998). La vie secrète des fromages, le rôle du génie génétique. *Biofuture*, **177**, 24-27

Deutcher, J. et M.H. Saier (1983). ATP-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation of a seryl residue in HPr, a phosphate carrier protein of the phosphotransferase system in *Streptococcus pyogenes*. *Proceeding of National Academy of Sciences*, **80**, 6790-6794

Deutcher, J. B. Pevec, K. Beyreuther, H.H. Kiltz et W. Hengstenberg (1986). Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry*, **25**, 6543-6551

Deutscher, J., A. Galinier, et I. Martin-Verstraete (2002). Carbohydrate Uptake and Metabolism. In *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives: from Genes to Cells. Edited by A. L. Sonenshein, J. A. Hoch et R. Losick. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 129-150

De Vos, W.M. et J. Hugenholtz (2004). Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. Trends in Biotechnology, **22**, 72-79

Devshony, S., E. Eteshola et A. Shani (1992). Characteristics and some potential applications of date palm (*Phoenix dactilifera* L.) seeds and seed oil. Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCS), **69**, 595-597

Dhaia, J.H. et J. Passat (1979). Production de sirop de datte (Debs). Projet régional de recherche sur les palmiers dattiers et les dattes dans le Proche-Orient et L'Afrique du Nord. F.A.O., Baghdad, 2-8

Dossonnet, V., V. Monedero, M. Zagorec, A. Galinier, G. Perez-Martinez et J. Deutscher (2000). Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. Journal of Bacteriology, **182**, 2582-2590.

Dowson, V.H.W. et A. Aten (1963). Récolte et conditionnement des dattes. Collection FAO , 70-80

Dowson, V.H.W. et A. Aten (1973). Composition et maturation. Récolte et conditionnement des dattes. Collection F.A.O, 72, 16-51

Driessen, F.M., F. Kingma et J. Stadhouders (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced par *Streptococcus thermophilus*. Netherlands Milk and Dairy Journal, **36**, 135-144

El-Akidi Hassen, H. (1982). Les sucres de dates, les fermentations et les domaines d'application dans le monde arabe. Séminaire sur les sucres de dattes, Baghdad, 4-9 décembre, 100-111

El Baradi, T.A (1968). Processing and by-products of dates. Tropical Abstracts, **23**, 9, 541-546

Estavove, P. (1990). Note technique: valorisation de la date. CIHEAM (Centre International des Hautes Etudes Agronomiques Méditerranéennes. Paris. Options Méditerranéennes, Sér. A/11,302-318

Famelart M.H., A. Kobilinsky, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud (1987). Influence of temperature, pH and dissolved oxygen on growth of *Brevibacterium linens* in a fermentor. Applied of Microbiology and Biotechnology, **25**, 5, 442-448

Fitzpatrick, J.J. et U. O'Keeffe (2001). Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for producing lactic acid. Process Biochemistry, **37**, 183-186

Flambart, B., J. Richard et J. Juillard (1997). Interaction between proteolytic strain of *Lactococcus lactis* influenced by different types of proteinase during growth in milk. Applied and Environmental Microbiology, **63**, 2131-2135

Foucaud, C., E.R.S. Kunji, A. Hagting, J. Richard, W.N. Konnings, M. Desmazeaud et B. Poolman (1995). Specificity of peptide transport systems with transports: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *Journal of Bacteriology*, **177**, 4652-4657

Gadgil C.J et K.V. Venkatesh (1997). Structured model for batch culture growth of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **68**, 1, 89-93

Galinier, A., J. Haiech, M.C. Kilhoffer, M. Jaquinod, J. Stulke, J. Deutscher et I. Martin-Verstraete (1997). The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proceeding of National Academy of Sciences U S A*, **94**, 8439-8444

Galinier, A., M. Kravanja, R. Engelmann, W. Hengstenberg, M.C. Kilhoffer, J. Deutscher et J. Haiech (1998). New protein kinase and protein phosphatase families mediate signal transduction in bacterial catabolite repression. *Proceeding of National Academy of Sciences U S A* **95**, 1823-1828

Ganzalez-Vara, Y.R.A., D. Pinelli, M. Rossi, D. Fajner, F. Magelli et D. Matteuzzi (1996). Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* ssp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* ssp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81**, 548-552

Garde, A., G. Gonsson, A.S. Schmidt et B.K. Ahring (2002). Lactic acid production wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology*, **81**, 217-223

Gätje, G. et G. Gottschalk (1991). Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **34**, 446-449

Geis, A., B. Kiefer et M. Teuber (1986). Proteolytic activities of lactic streptococci isolated from dairy starter cultures. *Chemie, Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel*, **10**, 3, 93-95

Giraud, E., B. Belog et M. Raimbault (1991). Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **36**, 1, 96-99

Goksungur, Y. et U. Güvens (1999). Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **74**, 2, 131-136

Goksungur, Y., M. Gündüz et S. Hersa (2005). Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 1282- 1290

Goncalves, L.M.D., A.M.R.B. Xavier, J.S. Almeida et M.J.T. Carrondo (1991). Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microbiology and Technology*, **13**, 4, 314-319

- Guoqiang, D., R. Kaul et B. Mattiasson (1991).** Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production. *Applied of Microbiology and Biotechnol*, **36**, 3, 309-314
- Guyot, J.P., M. Calderon et J. Morlon-Guyot (2000).** Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010^T. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 1, 176-182
- Hamad, A., A.L. Mustafa et M.S. El Kahtani (1982).** Possibility of utilising dates syrups as sweetening and flavouring agent in ice cream making. *Proceeding of the first symposium on the Date Palm in Saudi Arabia*, 23-25 mars, 544-549
- Haas, A.R.C et D.E. Bliss (1935).** Growth and composition of Deglet Noor dates in relation to water injury. *Hilgardia*, **9**, 295-344
- Heriban, V., E. Sturdik, L. Zalibera et P. Matus (1993).** Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Letters in Applied Microbiology*, **16**, 5, 243-246
- Hoefnagel, M.H.N., M.J.C. Starrenburg et D.E. Martens (2002).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach : kinetic modelling, metabolic control experimental analysis. *Microbiology*, **148**, 1003-1013.
- Hofvendahl, K et B. Hahn-Hägerdal (2000).** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 2, 87-107
- Hujanen, M. et Y.Y. Linko (1996).** Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **45**, 307-313
- Hussein, F., S. Moustafa, M. Elkahtani, F. El-Samiraie et A. El-Zeid (1974).** Studies on physical and chemical characteristics of eighteen date cultivars grown in Saoudi Arabia. *Kingdom of Saoudi Arabia of Agriculture, Research bulletin*, **4**, 5-18
- Hutkins, R., A. Howard, A. Morris et Larry L. McKay (1985).** Galactose transport in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environment Microbiology*, **50**, 772-776
- Jalaluddin, A.K., K.O. Abulnaja, T.A. Kumosani et A. Abou Zeid (1995).** Utilisation of Saudi date sugars in production of baker's yeast. *Bioresource Technology*, **53**, 63-66
- Jault, J. M., S. Fieulaine, S. Nessler, P. Gonzalo, A. Di Pietro, J. Deutscher et A. Galinier (2000).** The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 1773-1780
- Juillard, V., H.E Spinnler, M.J. Desmazeaud et C.Y. Boquien (1987).** Phénomènes de coopération et inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en Industrie laitière. *Le Lait*, **67**, 149-172

Juillard, V., M.J. Desmazeaud, H.E. Spinnler (1988). Mise en évidence d'une activité uréasique chez *Streptococcus thermophilus*. Canadian Journal of Microbiology, **34**, 818-822

Juillard V, Furlan S, Foucaud C, Richard J, (1996a). Mixed cultures of proteinase-positive and proteinase-negative strains of *Lactococcus lactis* in milk. Journal of Dairy Science **79**: 964-970.

Juillard,V., C. Foucaud, M. Desmazeaud et Richard, J. (1996b). Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. Le Lait, **76**, 13-24

Juillard, V et J. Richard (1994). Mixed cultures in milk of proteinase-positive and a proteinase-negative variant of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: influence of initial pourcentage of proteinase-positive cells on the growth parameters of each strain and on the rate of acidification. Le Lait, **74**, 3-12

Kalbitzer, H.R., W. Hengstenberg, P. Rosch, P. Muss, P. Bernsmann, R. Engelmann, M. Dorschug et J. Deutscher (1982). HPr proteins of different microorganisms studied by hydrogen-1 high-resolution nuclear magnetic resonance: similarities of structures and mechanisms. Biochemistry, **21**, 2879-2885.

Kamel, B.S. (1979). Dates as a potential substrate for single cell protein production. Enzyme of Microbiology and Biotechnology, **1**, 180-182

Kandler, O. et N. Weiss (1986a). Regular nonsporing Gram-positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams, Wilkins, Baltimore, **2**, 1208-1209

Kandler, O. et N. Weiss (1986b). Genus *Lactobacillus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams, Wilkins, Baltimore, **2**, 1209-1234

Khatchadourian, H.A. W.N. Sawaya, J.K. Khalil, W.M. Safi et A.A. Mashadi (1982). Utilisation of dates (*Phoenix dactylifera* L.), grown in the kingdom of Saudi Arabia in various date products. Proceeding of the first Symposium on the date palm in Saudi Arabia, 23-25 mars, 504-517

Kim, H., Y.J. Wee, J.N. Kim, J.S. Yun et H.W. RYU (2006). Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus* sp. RKY2. Applied Biochemistry and Biotechnology, **129**, 694-704

Klinkerberg, G., K.Q. Lystad, D.W. Levine et N. Dyrset (2001). Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in chitosan and alginate coated beads. Journal of Dairy Science, **84**, 1118-1127

Know, S., P.C. Lee, E.G. Lee, Y.K. Chang et N. Chang (2000). Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology, **26**, 209-215

Known, S., I.K. Yoo, W.G. Lee, H.N. Chang et Y.K. Chang (2001). High rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two stage membrane cell-recycle bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, **73**, 25-34

- Konings, W.N et R. Otto (1983).** Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **49**, 247-257
- Konings, W.N., B. Poolman et A.J.M. Driessen (1989).** Bioenergetics and solute transport in lactocci. *Critical Reviews in Microbiology*, **16**, 419-476
- Kotzanmanidis, C., T. Roukas et G. Skaracis (2002).** Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 441-448
- Kravanja, M., R. Engelmann, V. Dossonnet, M. Bluggel, H.E. Meyer, R. Frank, A. Galinier, J. Deutscher, N. Schnell et W. Hengstenberg (1999).** The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Molecular Microbiology* **31**, 59-66.
- Krischke, W., M. Schröder, W. Trösch (1991).** Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* ssp. *casei*. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, 573-578
- Kulozik, U., et J. Wilde (1999).** Rapid lactic acid production at high cell concentration in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 297-302
- Kumar Dutta, S., A. Mukherjee, et P. Chakraborty (1996).** Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: Simulation and modelling. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, 410-413
- Kunji, E.R.S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman et W.N. Konnings (1996).** The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **70**, 187-221
- Kunji, E.R.S., E.J. Smid, R. Plapp, B. Poolman et W.N Konnings (1993).** Di-Tripeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriol*, **175**, 2053-2059
- Kurbanuglu, E.B. et N.I. Kurbanuglu (2003).** Utilization of lactic acid production with a new acid hydrolysis of ram horn waste. *FEMS Microbiology Letters*, **225**, 29-34
- Kurosawa, H., H. Ishikawa et A.L. Tanaka (1988).** Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, 183-187
- Lane, J.H., L. Eynon (1923).** Determination of reducing sugars by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. *Journal of Society Chemical Industry, Transactions and communications*, **42**, 32-36.
- Lan, C.Q., G. Oddon, D.A. Mills et D.E. Block (2006).** Kinetics of *Lactococcus lactis* growth and metabolite formation under aerobic and ananerobic condition in the presence or absence of hemin. *Biotechnology and Bioengineering*, **95**, 6, 1071-1079
- Larpent, J.P (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne: Les principaux groupes bactériens. Ed. Technique et Documentation, 182

Law, J., et A. Haandrikman (1997). Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **7**, 1-11.

Ledesma, O.V., A.P. De Ruiz Holdago et G. Olivier (1977). A synthetic medium for comparative studies of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **42**, 123-133

Liberman E.S. et A.S. Bleiweis (1984). Role of the phosphoenolpyruvate-dependent glucose phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* GS5 in the regulation of lactose uptake. *Infection and Immunity*, **43**, 536–542.

Liew, S.L., M. Rostarizan, A.R. Raha, YW. Ho et B.A. Arbakariya (2006). Improved production of live cells of *Lactobacillus rhamnosus* by continuous cultivation using glucose-yeast extract medium. *Journal of Microbiology*, **44**, 439-446

Linko, Y. et Y. Javanainen (1996). Simultaneous liquefaction, saccharification and lactic acid fermentation on barley starch. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 118-123

Lipinski, E.S et R.G. Sinclair (1986). Is lactic acid a commodity chemical? *Chemical Engineering Progress*, **82**, 8, 26-32

Litchfield, J.H. (1996). Microbiological production of lactic acid. *Advances in Applied Microbiology*, **42**, 45-95

Liu, J.Q, T. Kurihara, M. Miyagi, N. Esaki et K. Soda (1995). Reaction mechanism of L-2-haloacid dehalogenase of *Pseudomonas* sp. YL. Identification of Asp10 as the active site nucleophile by 180 incorporation experiments. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 18309-18312

Luedeking, R. et E.L. Pirret (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbial Technology and Engineering*, **1**, 393-412

Luesink, E.J., O.P. Kuiper et W.M. De Vos (1998). Regulation of the carbohydrate metabolism in *Lactococcus lactis* and other lactic acid bacteria. *Le Lait*, **78**, 69-76

Lunt, J. (1998). Large-scale production, properties commercial applications of polyactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*, **59**, 145-152

Magnuson, J.K.et L.L. Lasure (2004). Organic acid productionby filamentous fungi. In *advances in fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*.Ed. Jane et Lene Lange Kluwer Academic, 307-340

Major, N.C. et A.T. Bull (1985). Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters*, **7**, 401-405

Marshall, V.M.E. et B.A Law (1984). Physiology and growth of dairy lactic-acid bacteria. In: *Advances in the Microbiology and the Biochemistry of cheese and fermented Milk*, Ed. F.L Davies et B.A Law, 67-98

Messens, W., J. Verluyten, F. Leroy et L. De Vuyst (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. International Journal of Food Microbiology, **81**, 41-52

Mijakovic, I., S. Poncet, A. Galinier, V. Monedero, S. Fieulaine, J. Janin, S. Nessler, J.A. Marquez, K. Scheffzek, S. Hasenbein, W. Hengstenberg et J. Deutscher (2002). Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: A relic of early life? Proceeding of National Academy of Sciences *USA*

Mikki, M.S., W.F. Al TAI et T.T. Jaafar (1978). Studies on date jams1-suitability of different Commercial Date Cultivars for Jam Making. Palm and dates Res. Center, Baghdad, Iraq. Tech. Bull 6, 10

Miura, S., T. Arimura, M. Hoshino, M. Kojima, L. Dwiarti et M. Okabe (2003). Optimization and scale-up of L- lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. Journal of Bioscience and Bioengineering, **96**, 65-69

Miura, S., T. Arimura, N. Itoda, L. Dwiarti, J.B. Feng, C.H. Bin et M. Okabe (2004). Production of L-lactic acid from corncob. Journal of Bioscience Bioengineering, **97**, 153-157

Miwa, Y., A. Nakata, A. Ogiwara, M. Yamamoto et Y. Fujita (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (cre) of *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Research, **28**, 1206-1210

Moldes, A.B., J.L. Alonso et J.C. Parajo (2001). Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **76**, 279-284

Monnet, V., D. Le Bars, E. Neviani et J.C. Gripon (1987). Partial characterization and comparison of cell wall proteinases from 5 strains of *Streptococcus lactis*. Le Lait, **67**, 51-61

Monnet V. et J.C. Gripon (1994). Métabolisme azoté des bactéries lactiques. Dans: Bactéries Lactiques. H. De Roissart et F.M. Luquet. Eds, Loriga, **1**, 331-347.

Monteagudo, J.M., L. Rodriguez, J. Rincon et J. Fuertes (1997). Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **68**, 271-276

Morabito, M. (1994). Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* sur lactoserum: Etudes cinétiques, Modélisation et Simulation de procédé intégré, Thèse INPL Biotechnologies et Industries Alimentaires

Monod, J. (1942). Recherche sur la croissance des cultures bactériennes, Ed. Hermann et Cie, Paris

Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1982a). Purification and properties of a new enzyme, DL-2- haloacid dehalogenase, from *Pseudomonas* sp. Journal of Bacteriology, **150**, 522-527

Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1982b). Bacterial assimilation of D-and L-2 chloropropionates and occurrence of new dehalogenase. *Archives of Microbiology*, **131**, 179-183

Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1984). Enzymatic preparation of D and L lactic acid from racemic 2-chloropropionic acid. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**, 805-806

Mulligan, C.N. et B.F. Safi (1991). Continuous production of ammonium lactate by *Streptococcus cremoris* in a three-stage reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1173-1181

Munier, P. (1973). Le palmier dattier. G-P Maisonneuve et Larose, Paris. ISBN 2-7068-0563-3, 141-150

Mustafa, A.I., A.M. Hamad et M.S. Kahtani (1982). Date varieties for jam production. Proceeding of the first Symposium on the Date palm Saudi Arabia, 23-25 March, 496-501

Nancib, N., A. Nancib et J. Boudrant (1997). Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource and Technology*, **60**, 67-71

Nancib, N., M. Ghoul, L. Larous, A. Nancib, L. Adimi, M. Remmal, J. Boudrant (1999). Use of date products in production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology*, **67**, 291-295

Narayanan, N., P.K. Roychoudhury et A. Srivasta (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, **7**, 2, 167-179

Nardi-Dei, V., T. Kurihata, C. Park, N. Esaki et K. Soda (1997). Bacterial DL-2 haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. Strain 113: gene cloning and structural comparison with D-and L-2 haloacid dehalogenases. *Journal of Bacteriology*, **179**, 4232-4238

Naveena, B.J., M. Altaf, K. Bhadriah et G. Reddy (2005). Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technolgy*, **96**, 485-490

Neves, A. R., A. Ramos, M.C. Nunes, M. Kleerebezem, J. Hugenholtz, W.M. de Vos, J. Almeida et H. Santos (1999). In vivo nuclear magnetic resonance studies of glycolytic kinetics in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 200-212

Neysens, P. et L. De Vuyst (2005). Kinetics and modelling of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, **16**, 95-103

Nikolajsen K., Nielsen J. et J. Villadsen (1990). Structured modelling of a microbial system : III. Growth on mixed sugar. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1, 24-29

Nielsen, J., K. Nikolajsen et J. Villadsen (1991a). Structured modeling of a microbial system. I, A theoretical study of lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1, 1-10

Nielsen, J., K. Nikolajsen et J. Villadsen (1991b). Structured modeling of a microbial system. II, Experimental verification of structured lactic acid fermentation model. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 1, 11-23

Nolasco-Hipolito, C., T. Matsunaka, G. Kobayashi, K. Sonomoto et A. Ishizaki (2002). Synchronized fresh cell bioreactor system for continuous L-(+)-lactic acid production using *Lactococcus lactis* IO-1 in hydrolysed sago starch. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93**, 281-287

Norton, S., C. Lacroix et J.C. Vuilleumard (1993). Effect of pH on the morphology of *Lactobacillus helveticus* in free-cell batch and immobilized- cell continuous fermentation. *Food Biotechnology*, **7**, 3, 235-251

Nur, A., A.M. Zin et A.R. Ahmed (1981). Physico-chemical composition of common Sudanese date cultivars and their suitability for Jam making. *The Date Palm Journal*, **1**, 99-106

Oda, Y., K. Saito, H. Yamauchi et M. Mori (2002). Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*, **45**, 1-4

Oh, H., Y.J. WEE, J.S. Yun et H.W. Ryu (2003). Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **107**, 603-613

Oh, H., Y.J. Wee, J.S. Yun, S.H. Han, S. Jung et H.W. Ryu (2005). Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*, **96**, 1492-1498

Ohara, H. et M. Yahata (1996). L-lactic acid production by *Bacillus* sp. In anaerobic and anaerobic culture. *Journal of fermentation and Bioengineering*, **81**, 272-274

Ohkouchi, Y. et Y. Inoue (2006). Direct production of L-(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. *Bioresource Technology*, **97**, 1554-1562

O'Marro, A. (1993). Lactic acid polymers, *Cargill News*, **58**, 4, 21-25

Otto R., T. Vije, B. Ten Brink, B. Klont et W.N. Konings (1985). Energy metabolism in *Streptococcus cremoris* during lactose starvation. *Archives of Microbiology*, **141**, 348-352

Pajpai-Dikshit, J., A.K. Suresh et K.V. Venkatesh (2003). An optimal model for representing the kinetics of growth and product formation by *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 5, 481-486

Park, E.Y, P.N. Anh et N. Okuda (2004). Bioconversion of waste office paper to L-(+)- lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, **93**, 77-83

- Park, E.Y., Y. Kosakai et M. Okabe (1998).** Efficient production of L(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress*, **14**, 699-704
- Patel, M., M. Ou, L.O. Ingram et K.T. Shanmugam (2004).** Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to L(+)-lactic acid by a thermotolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, **26**, 865-868
- Patron, A., S. Patron et H. Swinzow (1954).** La composition chimique des dattes marocaines considérées du point de vue de leur valeur alimentaire. *Fruits*, **9**, 443-449
- Pauli, T. et J.J. Fitzparck (2002).** Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic acid by fermentation with *Lactobacillus casei*. *Process Biochemistry*, **38**, 1-6
- Payne J.W. (1980).** *In: Microorganisms and Nitrogen Sources*. Ed. J.P. Payne; John Wiley and Sons Ltd, 211.
- Payot, T, Z. Chemaly et M. Fick (1999).** Lactic acid production by *Bacillus coagulans*- Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**, 191-199
- Poolman, B., E.J. Smid, H. Velkamp et W.N. Knings (1987).** Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, **169**, 1460-1468
- Ramstrom, H., S. Sanglier, E. Leize-Wagner, C. Philippe, A. Van Dorsselaer et J. Haiech (2003).** Properties and regulation of the bifunctional enzyme HPr kinase/phosphatase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 1174-1185.
- Reiter, B. et A. Moller-Madsen (1963).** Reviews of the progress of dairy science. Section B Cheese and butter starters. *Journal of Dairy Research*, **30**, 419-449
- Reizer, J. et C. Panos (1980).** Regulation of beta-galactoside phosphate accumulation in *Streptococcus pyogenes* by an expulsion mechanism. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* **77**, 5497-5501.
- Reizer, J., M.J. Novotny, C. Panos et M.H. Saier (1983).** Mechanism of inducer expulsion in *Streptococcus pyogenes*: a two-step process activated by ATP. *Journal of Bacteriology*, **156**, 354-361.
- Reizer, J., C. Hoischen, F. Titgemeyer, C. Rivolta, R. Rabus, J. Stulke, D. Karamata, M.H. Saier et W. Hillen, W. (1998).** A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular Microbiology*, **27**, 1157-1169.
- Richter, K. et C. Berthold (1998).** Biotechnological conversion of sugar and starchy crops into lactic acid. *Journal of Agricultural Engineering Research*, **71**, 181-191
- Richter, K. et A. Träger (1994).** L(+) lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid-state fermentations. *Acta Biotechnologica*, **14**, 367-378

Roble, N.D., J.C. Ogbonna et H. Tanaka (2003). L-lactic acid production from raw cassava starch in a circulating loop bioreactor with cell immobilized in loofa (*Luffa cylindrical*). *Biotechnology Letters*, **25**, 1093-1098

Rodriguez, A.V. et M.C. Manca de Nadra (1995). Effect of pH and hydrogen peroxide produced by *Lactobacillus hilgardii* on *Pediococcus pentosaceus* growth. *FEMS Microbiology Letters*, **128**, 59-62

Rojan, P.J., K.M. Nampoothiri, A.S. Nair et A. Pandey (2005). L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, **27**, 1685-1688

Rojan, P.J. et K.M. Nampoothiri (2006). Simultaneous saccharification and L(+) lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of *Lactobacilli*. *Biotechnology Letters*, **28**, 1823-1826

Roukas, T., et P. Kotzekidou (1991). Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, **13**, 33-38

Roukas, T. et P. Kotzekidou (1996). Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed reactor. *Food Biotechnology*, **10**, 231-242

Roukas, T. et P. Kotzekidou (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 199-204

Roychoudhury, P.K., A. Srivasta et V. Sahai (1995). Extractive bioconversion of lactic acid. In: Fiechter, A. ed. *Advances in Biotechnological Engineering*, **53**, 61-87

Rygg, G.L. (1948). Acidity in relation to quality in the date fruit. Annual report. Date Growers Institute, **25**, 32-33

Rygg, G.L. (1953). Factors affecting the spoilage of dates at room temperature. Annual report. Date Growers Institute, **30**, 10-14

Saier, M. H. et M. Crasnier (1996). Inducer exclusion and the regulation of sugar transport. *Research in Microbiology*, **147**, 482-489.

Sawaya, W.N., H.A. Khatchadourian, J.K. Khalil, W.M. Safi et A. Al-Shalhat (1982). Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *Journal of Food and Science*, **47**, 1489-1497

Sawaya, W.N., J.K. Khalil, W.J. Safi et H.A. Khatchadourian (1983). Date bars fortified with soy protein isolate and dry skim milk. *Journal of Food Science*, **48**, 1503-1506

Schepers AW, Thibault J, Lacroix C., 2000. Comparison of neural networks and non linear regression models for *Lactobacillus helveticus* growth in pH-controlled batch cultures. *Enzyme. Microb. Technol.* **26**, 431-445.

Schepers, A.W, J. Thibault et C. Lacroix (2002). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I: Multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, **30**, 176-186

Schleifer, K.H, J. Kraus, C. Dvorak, R. Klipper-Balz, M.D. Collins et W. Fisher (1985). Transfert of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **6**, 183-195

Senthuran, A., V. Senthuran, R. Hatti-Kaul et B. Mattiasson (1999). Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor. A step towards optimization. *Journal of Biotechnology*, **73**, 61-70

Shahbal, S., D. Hemme et M.J. Desmazeaud (1991). High cell-wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. *Le Lait*, **71**, 351-357

Singh, S.K et A.P. Ahmed SU (2006). Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*, **41**, 991-1000

Smart, J.B et T.D. Thomas (1987). Effect of oxygen on lactose metabolism in lactic streptococci. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 533-541

Smid, E.J., A.J. Driessen et W.N. Konings (1989). Mechanism and energetics of dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **171**, 292-298

Smid, E.J., et W.N. Konings (1990). Relationship between utilization of proline and proline-containing peptides and growth of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **172**, 5286-5292

Smith, B.R., R.D. McBean et G.C. Cox (1977). Separation of lactic acid from lactose fermentation liquors by reverse osmosis. *Australian Journal of Dairy Technology*, **77**, 23-25

Snell, E.S. (1989). Nutrition research with lactic acid bacteria : A retrospective view, *Annual Reviews of nutrition*, **9**, 1-19

Sreenath, H.K, A.B. Moldes, P.K. Koegel et R.J. Straub (2001). Lactic acid production from agricultural residues. *Biotechnology Letters*, **23**, 179-184

Stieber, R.W., G.A. Coulman., et P. Gerhardt (1977). Dialysis continuous process for ammonium-lactate fermentation whey: experimental tests, *Applied and environmental Microbiology*, **34**, 733-739

Tango, M.S.A. et A.E. Ghaly (1999). Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, **42**, 1791-1800

Taniguchi, M., T. Tokunaga, K. Horiuchi, K. Hoshino, K. Sakai et T. Tanaka (2004). Production of L-lactic acid from a mixture of xylose and glucose by co-cultivation of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **66**, 160-165

Thomas, T.D. (1976). Regulation of lactose metabolism in group N streptococci. *Applied and Environment Microbiology*, **32**, 474-478

Thomas, T.D. et G.G. Pritchard (1987). Proteolytic enzymes of dairy starter cultures. *FEMS Microbiology Review*, **46**, 245-268

Thompson, J.T. et D. Thomas (1977). Phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglycerate: endogenous energy source (s) for sugar accumulation by starved cells of *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **130**, 583-595.

Thompson, J., K.W. Turner et T.D. Thomas (1978). Catabolite inhibition and sequential metabolism of sugars by *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **133**, 1163-1174

Thompson, J. et D.A. Torchia (1984). Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and ¹⁴C fluorography in studies of glycolysis and regulation of pyruvate kinase in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **158**, 791-800.

Thompson, J. et C.R. Gentry-Weeks (1994). Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. *Bactéries Lactiques*, Ed. De Roissard, H. et al. Loriga-Uriage, **1**, 239-29

Thompson, J. et M.H. Saier (1981). Regulation of methyl- β -D- thiogalactoside -6-phosphate accumulation in *Streptococcus lactis* by exclusion and expulsion mechanisms. *Journal of Bacteriology*, **146**, 885-894.

Thompson, J. et B.M. Chassy (1983). Intracellular hexose-6-phosphohydrolase from *Streptococcus lactis*: purification, properties, and function. *Journal of Bacteriology*, **156**, 70-80

Tuli, A., R.P. Sethi, P.K. Khanna, S.S. Marwaha (1985). Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. *Enzyme Microbial and Technology*, **7**, 164-168

Tango, M.S.A. et A.E. Ghaly (1999). Kinetics of batch production of lactic acid from cheese whey. *Annual International Meeting, Toronto, July 18-21 ASAE 42 (6)*, 1791-1800.

Turrel, F. (1940). Structural and chemical factors in relation to fungus spoilage of dates. *Annual report. Date Growers Institute*, **17**, 5-11

Tynkkynen, S., G. Buist, E. Kunji, B. Poolman, G. Venema et A.J. Haadrikman (1993). Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, **175**, 7523-7532

Vanier P : Datte: La datte au fil du temps.

<http://www.passeportante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments> 2005

- Venkatesh, K.V (1997).** Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. *Bioresource Tecnology*, **62**, 91-98
- Viana, R. et V. Monedero (2000).** Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Molecular Microbiology*, **36**, 570-584
- Vick Roy, T.B. (1985).** Lactic acid, *Comprehensive Biotechnology*, Ed. Moo Yoong, M.M, Pergamon Press, 761-776
- Vick Roy, T.B., H.W. Blanch, C.R. Wilke (1982).** Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a hollow fiber fermenter. *Biotechnology Letters*, **4**, 483-488
- Visser, S., F.E. Exterkate, C.J. Slangen et G.J.C.M. De Veer (1986).** Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine α_{s1} , β and k -casein. *Applied and Environment Microbiology*, **52**, 1162-1166
- Vishnu, G., G. Seenayya et G. Reddy (2000).** Direct conversion of starch to L(+)-lactic acid amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. *Bioprocess Engineering*, **23**, 155-158
- Vishnu, G., G. Seenayya et G. Reddy (2002).** Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 429-433
- Wee, Y.J., J.N. Kim et H.W Ryu (2006a).** Biotechnological production of lactic acid and Its Recent Applications. *Food Technology and Biotechnology*, **44**, 2, 163-172
- Wee, Y.J., J.S. Yun, D. Kim et H.W. Ryu (2006b),** Batch and repeated batch production of L(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolysate and corn steep liquor., *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **33**, 431-435
- Wee, Y.J, J.S. Yun, D.H. Park et H.W. Ryu (2004a).** Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnology Letters*, **26**, 71-74
- Wee, Y.J., J.N. Kim, J.S. Yun et N.W. Ryu (2004b).** Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 568-573
- Weigel, N., D.A. Powers et S. Roseman (1982).** Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Primary structure and active site of a general phosphocarrier protein (HPr) from *Salmonella typhimurium*. *Journal of Biological Chemistry*, **257**, 14499-14509.
- Xiadong, W., G. Xuan et S.K. Rakshit (1997).** Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. *Biotechnology Letters*, **19**, 841-843

Yan, X.L., E. Khor, et L.Y. Lim (2001). Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *Journal of Biomedical Material research*, **58**, 358-365

Yannabar, V.M. et D.I.CI Wang (1991). Analysis of mass transfer for immobilized cells in an extractive lactic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 544-550

Yanez, R., A.B. Moldes, J.L. Alonso et J.C. Prajo (2003). Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Torquens*. *Biotechnology Letters*, **25**, 1161-1164

Yanez, R., J.L. Alonso et J.C. Parajo (2005). D(-)-lactic production from waste carboard. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **80**, 76-84

Ye, J.J., J. Reizer, X. Cui et M.H. Saier (1994a). ATP-dependent phosphorylation of serine-46 in the phosphocarrier protein HPr regulates lactose/H⁺ symport in *Lactobacillus brevis*. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, **91**, 3102-3106

Ye, J.J., J. Reizer, X. Cui et M.H. Saier (1994b). Inhibition of the phosphoenolpyruvate: lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 11837- 11844.

Yeh, P.L.Y., R.K. Bajpai et E.L. Iannotti (1991). An improvement kinetic model for lactic acid fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **71**, 1, 75-77

Yin, P.N, Y. Nishiya, Y. Kosakai, K. Yahira, Y.S. Park et M. Okabe (1997). Enhanced production of L(+) lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **84**, 249-253

Yoo, I.K., H.N. Chang, E.G. Lee, Y.K Chang et S.H. Moon (1996). Effect of pH on the production of lactic acid and secondary products in batch cultures of *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**, 482-486

Yoo, I.K, H.N. Chang, E.G. Lee, Y.K. Chang et S.H. Moon (1997). By-product formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*. *Biotechnology Letters*, **19**, 237-240

Yousif, A.K., N.D. Benjamin, A. Kado, S. Mehie Addin et S.M. Ali (1982). Chemical composition of four Iraq date cultivars. *Date Palm Journal*, **1**, 285-294

Youssef, M.K.E., M.A.H. El-Geddawy, M.N. El-Rify et B.R. Ramadan (1992). Study of amino acid, organic acid and free sugar composition of new valley dates and certain date products. *Acta Alimentaria*, **21**, 3, 325-335

Yu W., K. Gillies, J.K. Kondo, J.R. Broadbent et L.L. Mc Kay (1996). Loss of plasmid-mediated oligopeptide transport system in Lactococci: another reason for slow milk coagulation. *Plasmid*, **35**, 145-155.

Yun, J.S., Y.J. Wee, J.N. Kim et H.W. Ryu (2004). Fermentative production of DL-lactic acid from amylase treated rice and wheat brans hydrolysate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters*, **26**, 1613-1616

Yun, J.S., Y.J. Wee et H.W. Ryu (2003). Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme Microbial and Technology*, **33**, 416-423

Yun, J.S., Y.J. Wee, J.N. Kim et H.W. Ryu (2004). Fermentative production of DL-lactic acid from amylase-treated rice and wheat brans hydrolyzate by a novel lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters*, **26**, 1613-1616

Zayed, G. et J. Winter (1995). Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**, 362- 366

Zhou, Y., J.M. Dominguez, N. Cao, J. Du, et G.T. Tsao (1999). Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhysopus oryzae* ATCC 52311. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **78**, 401-407

Zouari, A., et M.J. Desmazeaud (1991). Caractérisation de bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. II. Souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et cultures mixtes avec *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, **71**, 463-482

Liste des publications et communications

1) Publications internationales :

Aicha NANCIB, N. NANCIB, D. MEZIANE-CHERIF, A. BOUBENDIR, M. FICK et J. BOUDRANT. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. *Bioresource Technology*, 2005, **96**, 63-67.

N. NANCIB, **Aicha. NANCIB**, A. BOUDJELAL, C. BENSLIMANE, F. BLANCHARD et J. BOUDRANT. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. *Bioresource Technology*, 2001, **78**, 149-153.

N. NANCIB, M. GHOUL, L. LAROUS, **Aicha NANCIB**, L. ADIMI, M. REMMAL, et J. BOUDRANT. Use of date products in production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*. *Bioresource Technology*, 1999, **67**, 291-295.

N. NANCIB, **Aicha NANCIB** et J. BOUDRANT. Use of waste date products in the fermentative formation fo baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 1997, **60**, 67-71.

2) Communications

NANCIB N., **NANCIB Aicha**, BOUDRANT J. Production de l'acide lactique sur jus de datte en culture pure et mixte par *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* Troisième colloque Franco-Roumain de chimie appliquée COFRoCA . Journées Scientifiques de Biotechnologies, 29 et 30, 2005 à Sétif. 20-Bacau du 22 au 26.

NANCIB Aicha, NANCIB N., MEZIANE-CHERIF D., BOUBENDIR A., FICK M., BOUDRANT J. Effet de la supplémentation du jus de datte en sources azotées et en vitamines B sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* susbsp. *rhannosus*. Séminaire régional « conservation des aliments, sécurité, qualité et procédés » Maroc, Rabat les 16 et 17 juin 2003.

NANCIB N., **NANCIB Aicha**, BOUDRANT J. Effets des sources de carbones pures et mixtes sur la production d'acide lactique à partir de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*. Séminaire régional Ouagadougou 8-10 Novembre 2005.

NANCIB N., **NANCIB Aicha**, BOUDRANT J. Optimisation de l'alimentation en glucose de jus de datte par *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* lors de la fermentation fed-batch. Séminaire d'animation régional. Technologies douces et procédés de séparation au service de la qualité et de l'innocuité des aliments. INSAT-Tunis, Tunisie/27-28-29 novembre 2006.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Jean-François CAVIN, Professeur, ENSBANA, Dijon

Monsieur Francis DUCHIRON, Professeur, U.R.C.A., UFR Sciences, Reims

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame DJIDEL Ayacha épouse NANCIB

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Production d'acide lactique par Lactobacillus casei subsp. rhamnosus sur jus de datte :
cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues"**

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 11 octobre 2007

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

Pour le Président

Le Vice-Président,


Jacques JARAY

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

L'objectif de ce travail a été de développer un procédé performant de production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* sur jus de datte.

Dans une première partie, des cultures en mode discontinu ont été réalisées afin d'étudier les besoins nutritionnels de la souche. Ces études ont pour but de décrire les effets des sources carbonées, azotées et les vitamines sur la production d'acide lactique. Nous avons montré que le sulfate d'ammonium est une bonne alternative économique et nous avons pu déterminer la faisabilité de minimiser l'ajout de l'extrait de levure par l'utilisation partielle de l'extrait de levure combinée avec du sulfate d'ammonium plus l'ajout de vitamines du groupe B. Des cultures pures et mixtes de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* ont été réalisées. Le système de culture mixte donne de meilleurs résultats concernant la production d'acide lactique et l'utilisation des sucres comparés à ceux obtenus en cultures pures de *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis*. L'effet des sucres purs (glucose et fructose) et mixtes (glucose/fructose) sur la production d'acide lactique a été étudié. La production d'acide lactique est plus importante avec un mélange de sucres qu'avec des sucres non mélangés ce qui explique les performances de fermentation sur jus de datte.

Dans une seconde partie, une stratégie d'alimentation du réacteur en culture semi-continue a été mise en œuvre, permettant d'améliorer les performances de la fermentation. Les deux facteurs influençant le bon fonctionnement sont le débit et la concentration du milieu d'alimentation.

Dans une troisième partie, une étude cinétique a été développée en réacteurs continus. Nous avons étudié l'influence du taux de dilution sur la croissance, l'utilisation du substrat et la production d'acide lactique. La productivité du procédé continu a été considérablement augmentée en comparaison avec le procédé discontinu.

Enfin, dans une dernière partie, un modèle a été établi. Ce modèle, bien qu'imparfait, permet apparemment de simuler la croissance, la consommation des sucres de jus de datte et la production d'acide lactique en culture discontinue.

Mots clés : *Lactobacillus casei*, jus de datte, acide lactique, cinétique, culture mixte, sucres mixtes, modélisation.

Abstract

The aim of this work was to develop an efficient process of lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* on date juice

In a first part, the batch cultures were realized to carry out the nutritional requirement of the strain. These studies allowed us to describe the effects of carbon substrates, nitrogen substrates and vitamins on the lactic acid production. We showed that ammonium sulphate is a satisfying economic alternative and we have determined feasibility of minimizing the addition of the yeast extract by the partial use of yeast extract combined with the ammonium sulphate plus the addition of vitamins of the group B. Pure and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* were carried out. The mixed system gives better results concerning the lactic acid production and the use of the sugars compared with those obtained in pure cultures of *Lactobacillus casei* or *Lactococcus lactis*. The effect of pure sugars (glucose and fructose) and mixed sugars (glucose/fructose) on the lactic acid production was studied. The lactic acid production is more important on mixed sugars than on pure sugars what explains the performances of fermentation on date juice.

In a second part, a mode of fed batch operations was defined to improve the performances of the fermentation. The two factors influencing the process are the feeding rate and the concentration of the feeding medium.

In a third part, kinetic study in continuous culture was developed. We studied the influence of dilution rate on growth, substrate utilization and lactic acid production. The productivity of the continuous process was considerably increased in comparison with the batch process.

Finally, a tentative model has been established for the fermentation process. The corresponding model, although not perfect, is apparently able to simulate growth rate, substrates uptake and lactic acid production in batch culture.

Key words: *Lactobacillus casei*, date juice, Lactic acid, kinetic, mixed culture, mixed sugars, modelling.