

وزارة الجامعات والبحث العلمي
Ministère aux Universités et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

DEPARTEMENT Génie de l'Environnement

PROJET DE FIN D'ETUDES

en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat

SUJET

ETUDE CINETIQUE ET MODELISATION
DE LA PRODUCTION DE P.O.U
A PARTIR DE LACTOSERUM

Proposé par :

Etudié par :

Dirigé par :

Mme Mameri D.

Mlle Aït Ali K.

Mme Mameri D.

PROMOTION

Octobre, 1992

Dédicaces



Je dédie ce travail

à mes chers parents ;

à mon frère Soufiene ;

à mes soeurs Amina, Djida et Zina ;

à ma grand-mère ;

à Mouna et Nacer ;

à mes amies Fatima, Fatma-Zohra, Houria et Sabah ;

à la mémoire de notre défunt président Mohamed BOUDIAF.

Remerciements



Au terme de ce travail, je tiens à remercier ma promotrice, Mme Mameri, pour m'avoir encadrée et surtout pour sa gentillesse et sa patience :

La présidente et les membres du jury pour l'honneur qu'il me font en acceptant de juger ce travail :

Mr Mameri pour m'avoir autorisée à utiliser son laboratoire, et pour son aide précieuse :

Les enseignants du département qui m'ont apporté leurs conseils :

Les techniciens de laboratoire Nouar et Mahfoud pour leur aide quotidienne :

Je remercie également tous mes proches qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de mon travail. En particulier, mon frère pour tous les efforts qu'il a déployé pour réaliser ce polycopié avec le plus grand soin, et sans l'aide de qui je n'aurai pas pu achever ce travail à temps. Qu'il trouve l'expression de ma gratitude et de mon affection :

Je tiens finalement à exprimer ma reconnaissance à Mr Boubidi N. pour tout le travail qu'il accompli.

الموضوع : دراسة حركية وبناء نموذج لإنتاج بروتين لوحيد الخلية إطلاقاً من مصالة اللبن

ملخص : الهدف من دراستنا هو إنتاج بروتين لوحيد الخلية إطلاقاً من نفايات معمل ألبان وقد أقمنا حركية التزايد ونموذج يصورها .

Sujet : Etude cinétique et modélisation de la production de P.O.U à partir de lactosérum

Résumé : Le but de notre étude est la production de protéines d'organismes unicellulaires à partir de rejets de laiterie (lactosérum). Une cinétique de croissance ainsi qu'un modèle la simulants ont été établis.

Subject : Kinetic Study and Modelization of SCP Production from Whey

Summary : The goal of our study is the production of Single Cell Protein from the rejection of dairy (whey). A Kinetic of increase and a model that simulate it had been established.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES SYMBOLES

INTRODUCTION	2
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	4
CHAPITRE I LE LACTOSERUM	5
1. Origine du lactosérum	5
2. Différents types de lactosérums	5
3. Composition des lactosérums	5
4. La pollution par le lactosérum	8
CHAPITRE II PROTEINES D'ORGANISMES UNICELLULAIRES ET LEVURES	10
1. Les protéines	10
2. Rôle des protéines dans les organismes vivants	10
3. Les protéines d'organismes unicellulaires	10
4. Les levures	11
CHAPITRE III LES UTILISATIONS DU LACTOSERUM	19
1. Valorisation du lactosérum	19
2. Le lactosérum dans l'alimentation humaine	20
3. Le Lactosérum dans l'alimentation animale	20
4. Produits de fermentation à partir du lactosérum	20
5. Production de levures lactiques par le procédé BEL	21
6. Le procédé WASSERMAN	23
7. La valorisation du lactosérum en Algérie	24
CHAPITRE IV CINETIQUE MICROBIENNE	25
1. Bilan chimique de la croissance microbienne	25
2. La courbe de croissance microbienne	26
3. Influence de la concentration en substrat sur la croissance microbienne	28

CHAPITRE V MODELISATION	30
1. Introduction: Qu'est ce que la modélisation?	30
2. Quelques types de modèles mathématiques de croissance microbienne	30
3. Quelques modèles de croissance microbienne.....	31
PARTIE EXPERIMENTALE	34
CHAPITRE I MATERIEL EXPERIMENTAL	35
1. Matériel biologique	35
2. Les milieux de culture	35
3. Appareillage et produits	36
CHAPITRE II METHODES D'EXPERIMENTATION	37
1. Protocole complet de la fermentation	37
2. Mesure de la croissance.....	40
RESULTATS ET DISCUTIONS	42
CHAPITRE I LA CINETIQUE	43
1. Les courbes de croissance	43
2. Le taux de croissance.....	49
3. Le temps de doublement t_D ou temps de génération	54
4. Calcul de K_s et de μ_{max}	55
5. Le coefficient de conversion $Y_{X/S}$ ou rendement en biomasse	58
6. Calcul de la productivité.....	59
CHAPITRE II BILAN CHIMIQUE	61
1. Les coefficients stoechiométriques.....	61
2. La demande en oxygène.....	62
CHAPITRE III LA MODELISATION	64
CONCLUSION	69
REMARQUES GENERALES	71
BIBLIOGRAPHIE	
ANNEXES	

LISTE DES SYMBOLES

$^{\circ}D$	degré Dornic	
DO	Densité Optique	
K_s	Constante d'affinité	g/l
P_m	Productivité maximale	g/l.h
P_T	Productivité totale	g/l.h
S	Concentration en substrat	g/l
S_o	Concentration en substrat initiale	g/l
S'	Concentration en substrat critique	g/l
t	Temps	
T	Température	
X	Concentration microbienne	g M.S/l
X_o	Concentration microbienne initiale	g M.S/l
X_f	Concentration microbienne maximale	g M.S/l
$Y_{X/S}$	Coefficient de conversion	g de M.S cellulaire/g de substrat dégradé
μ	Taux de croissance	h^{-1}
μ_{max}	Taux de croissance maximal	h^{-1}
t_D	Temps de doublement	h

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
BIBLIOTHEQUE — المكتبة
Ecole Nationale Polytechnique

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Devant les besoins toujours croissants de l'homme en énergies de diverses natures, qui conditionnent son développement économique, les intérêts se sont tournés vers la recherche et l'exploitation de nouvelles sources d'énergie capables de remplacer celles qui s'épuisent et que l'on croyait infinies. Un problème analogue se pose pour l'alimentation. En effet, un accroissement de la population mondiale, qui n'est pas toujours accompagné d'une augmentation parallèle des ressources alimentaires (notamment protéiques), pose de graves problèmes de malnutrition et de faim dans les pays les plus défavorisés.

En effet, dans les années 70, la production mondiale en protéines animales, évaluée à 30 millions de tonnes par an, n'a été consommée que par les 2/3 des nations économiquement développées (Senez 72).

C'est pourquoi on assiste, depuis quelques années, au développement de nouvelles sources de protéines en complément au sources traditionnelles de protéines végétales et animales. On a tenté récemment d'obtenir la production, par des microorganismes, de protéines utilisables en alimentation humaine ou animale.

En effet, les microorganismes ont un taux de croissance relativement élevé, et leurs teneurs en protéines sont très importantes. C'est pourquoi les Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU) ou "Single Cell Protein" (SCP), peuvent jouer un rôle important pour combler le déficit protéique.

Ces microorganismes ont l'avantage d'utiliser des substrats peu coûteux tels que les sous-produits industriels et agricoles, mélasses, sérum de fromagerie, liqueurs sulfiteux résiduels de papeterie [1].

Il apparaît donc par là, une excellente méthode pour venir à bout des énormes quantités de déchets et sous-produits rejetés dans la nature et qui mettent en péril l'équilibre écologique de la nature.

La fabrication du fromage est l'une des plus anciennes industries alimentaires connues par l'homme. Cette fabrication donne lieu à un égouttage spontané ou forcé d'un liquide jaune-vert légèrement acidulé, appelé *lactosérum*.

Pendant de très longues années, ce sous-produit était en règle générale rejeté car il était jugé sans intérêt et sans valeur. [2]

Les statistiques de la F.A.O.* révèlent une production mondiale en lactosérum liquide de 8942 milliers de tonnes pour l'année 1985, dont 306 milliers pour l'Afrique. Depuis ces quantités n'ont cessé d'augmenter.

Notre travail comprend les étapes suivantes :

- Production de *Kluyveromyces fragilis* sur un milieu synthétique à différentes concentrations initiales en lactose : $S_0 = 5, 15, 20, \text{ et } 30 \text{ g/l}$ en gardant une température et un pH constants ($T=35^\circ\text{C}$ et $\text{pH}3$) ;

- Suivre la croissance microbienne en fonction du temps et établir les courbes de croissance $X = f(t)$;

- Définir les paramètres de croissance : temps de latence, taux de croissance μ et temps de doublement t_D pour chaque concentration S_0 ;

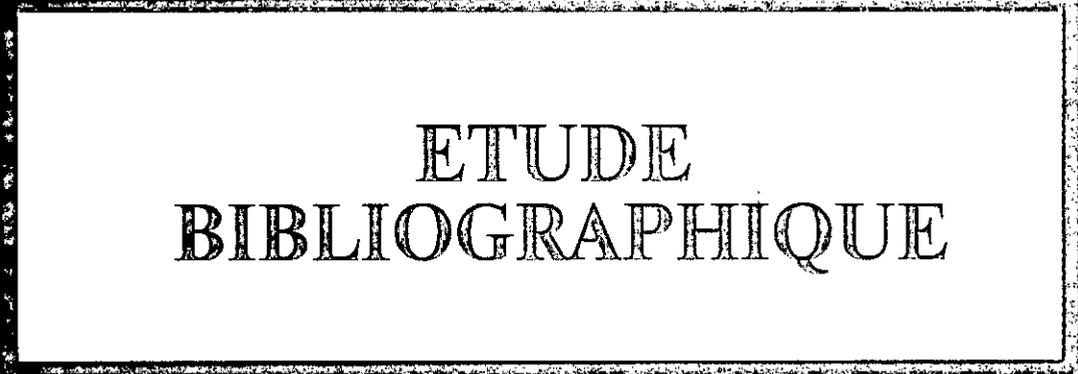
- Définir la constante d'affinité, K_s , de la souche pour le substrat ainsi que la concentration critique en substrat S' à partir du tracé de la courbe $\mu=f(S)$;

- Calculer les rendements en biomasse ou coefficients de conversion $Y_{X/S}$ et les comparer aux valeurs de la bibliographie ;

- Dresser le bilan chimique du processus de transformation du substrat (lactose) en biomasse (levure) ;

- Enfin choisir un modèle mathématique simulant la croissance et tester sa validité.

* Food and Agriculture Organization



ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Origine du lactosérum :

Les lactosérums sont des sous-produits provenant de la fabrication de certains produits du lait : les fromages, les caséines et leurs dérivés.

Chaque fois qu'un industriel ou un artisan met en oeuvre 1 litre de lait pour fabriquer un fromage, il y a production de 0,6 à 0,9 litre d'un liquide qui est le lactosérum. [2]

2. Différents types de lactosérums :

- **Les lactosérums doux** : Ce sont des sérums obtenus par coagulation du lait. Leur acidité est inférieure à 18° D (1ml de soude 0,1 N correspond à 10° D).

- **Les lactosérums acides** : Ils sont obtenus par coagulation lactique et provenant soit de la fabrication des fromages de type pâtes fraîches et pâtes molles, soit de la fabrication de caséine lactique. Leur acidité est supérieure à 18° D.

- **Les lactosérums de caséine acide** : Ils sont obtenus par coagulation par un acide minéral, et provenant de la fabrication des caséines aux acides.

3. Composition des lactosérums :

La composition des lactosérums varie selon leur origine. les plages de variation selon BOUDIER 1978 sont les suivantes:

Matière sèche totale	50	à	65 g/l
- Lactose	39	à	48 g/l
- acide lactique	1	à	8 g/l
- matière grasse	0,5	à	3 g/l
- sels minéraux	3	à	6 g/l
- matières azotées	6	à	8 g/l

Rapportées à 100 g de matière sèche, les compositions des différents lactosérums varient selon les moyennes données au tableau 1.

	LACTOSERUM		
	Présure	Lactique	Acide Minéral
Lactose	70 à 80	60 à 70	65 à 75
Protéines (8x5,39)	9 à 13,5	9 à 13,5	9 à 13
Azote non protéique	0,6 à 0,8	0,5 à 0,7	0,3 à 0,5
Matières minérales	7,5 à 9	9 à 14	9 à 13
Matières grasses	0,7 à 5	0,7 à 5	0,7 à 5
Acidité (en % acide lactique)	0,05 à 0,11	0,50 à 0,80	0,40 à 0,50

Tableau 1: Composition moyenne, rapportée à 100 g de matière sèche, des 3 types de lactosérum

(Le lactosérum français. Brochure Sopexa, 1974)

3.1. Le lactose

Le lactose est le constituant le plus abondant du lait. Il représente l'essentiel de la matière sèche du sérum. C'est un sucre réducteur, de formule $C_{12}H_{22}O_{11}$.

La figure 1 donne la structure d'une molécule de lactose.

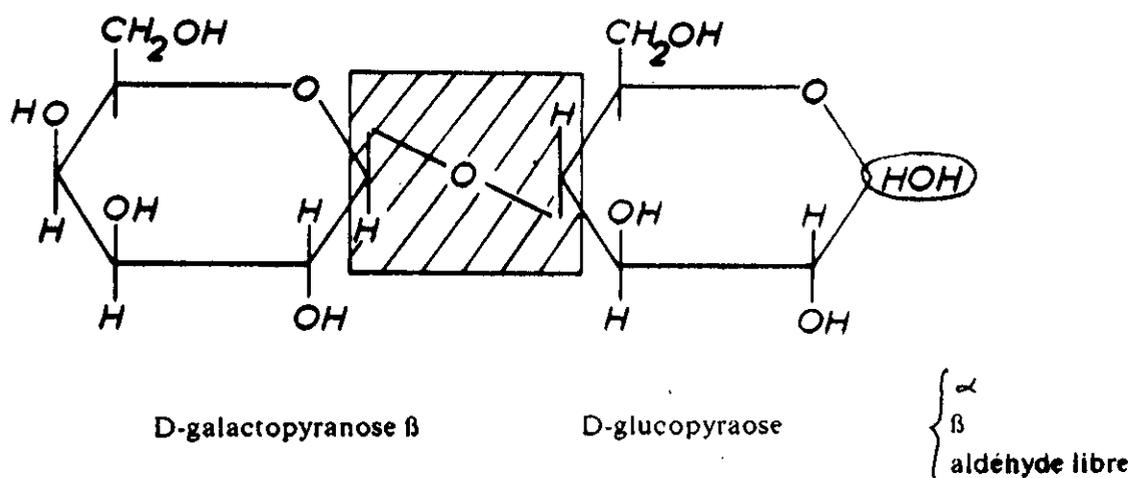


Figure 1 : Structure du lactose ou 4-D-glucopyranosyl- β -D-galactopyranose ou β -D-galactopyranosyl (1 \rightarrow 4)-D-glucopyranose [3]

L'hydrolyse chimique du lactose et galactose est plus difficile que celle du saccharose.

L'hydrolyse enzymatique se fait grâce à la β -galactosidase ou lactase. Cette enzyme est peu répandue, de rares levures la possèdent : *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida pseudotropicalis*, ... Les industriels utilisent celle de *K. fragilis*. [4] et [5]

Notons que dans certains sérums, le lactose est partiellement hydrolysé (0 à 6%). [6]

3.2 Les matières azotées :

Sur les 10 à 14 g de matières azotées présentes dans 100 g de matières sèches de sérum, 65% sont des protéines du sérum et 35% des matières azotées non protéiques : acide uréique ou ammoniacal, acides aminés libres (acide glutamique; lysine, etc ...), nucléotides. [6]

Les protéines du lactosérum :

Les protéines se répartissent en trois fractions :

- fraction globuline	10%
- fraction albumine	80%
- fraction protéose-peptone	10% [6]

3.3 Les matières minérales :

Dans 100 g de matières sèches du sérum on trouve différents éléments minéraux dont la teneur est en moyenne, la suivante:

Calcium	500	à	725	mg
Sodium	650	à	950	mg
Potassium	2400	à	2900	mg
Magnésium	80	à	160	mg
Phosphore	700	à	800	mg
Chlore	1500	à	1800	mg

Dans les sérums, les matières minérales se trouvent sous forme de sels : chlorures, sulfates, citrates, bicarbonates. [6]

3.4 Les vitamines :

Les vitamines sont en majorité, des vitamines hydrosolubles.

Parmi les vitamines présentes, on note des quantités importantes de riboflavine (B_2), d'acide pantothénique, de thiamine (B_1), de pyroxidine (B_6) et de vitamine C. [6]

3.5 Les matières grasses :

Une faible quantité de lipides du lait est entraînée dans le lactosérum brut. Dans les traitements industriels, le lactosérum est souvent écrémé; la matière grasse récupérée est utilisée dans la fabrication d'un beurre de second choix. [6]

4. La pollution par le lactosérum :

Le lactosérum devient un facteur de pollution une fois déversé dans les rivières et cours d'eau. Cela est dû à une très forte DBO. La DBO_5 d'un litre de sérum varie de 30000 à 40000 mg d' O_2 . Elle peut même atteindre 60000 mg d' O_2 .

Les effets de la pollution par le lactosérum :

En cas de rejet dans les cours d'eau naturels on observe une perturbation totale de l'écosystème. Il se produit une pollution bactérienne. Aucune espèce de poisson, aucun invertébré d'eaux pures, ne peut survivre dans la "zone septique". En revanche, il y a une prolifération d'espèces animales adaptées aux conditions écologiques très particulières qui y régissent: grande richesse en matières organiques fermentescibles et important déficit en oxygène. [7] et [8]

De plus la nature corrosive du lactosérum devrait interdire son rejet dans les réseaux d'évacuation. [9]

Quantification et caractérisation des effluents de laiterie :

On peut estimer la production mondiale en fromage à environ 8 milliards de kilogrammes par an. La production de lactosérum est égale à

9 fois ce poids, soit 72 billions de kilogrammes, et cette quantité ne cesse de croître [9]

La concentration en MES (matières en suspension) des effluents des laiteries est 400 mg/l.

Origine des effluents	Concentration (mg/l) d'oxygène
Fromagerie Laiterie (beurrerie, poudre de lait, fromagerie) Sérum	DCO _{moy} = 3200 (1100 à 4700) DCO _{moy} = 1650 (1300 à 1900) DCO = 63000
Fromagerie Laiterie (beurrerie, poudre de lait, fromagerie) Sérum	DBO ₅ = 2000 (1650 à 2700) DBO ₅ = 1050 (850 à 1200) DBO ₅ = 50000

Consommation d'oxygène d'effluents par la méthode de la DCO [10]
(norme AFNOR T90-101)

Le rapport DCO/DBO₅ marque la part relative des matières rapidement oxydables. On remarque que les rapports sont de 1,25 pour le sérum de fromagerie. [10]

En plus de la pollution des eaux, l'industrie laitière peut avoir d'autres impacts :

- l'atmosphère avec les poussières rejetées ;
- le bruit ;
- les rejets thermiques ;
- le stockage des produits dangereux.

La pollution en industrie laitière c'est de la matière première perdue dans les eaux de lavage, ou s'échappant par les cheminées des tours de séchage. [11]

1. Les protéines :

Les protéines sont connues depuis le milieu du XIX^e siècle comme étant l'un des éléments constitutifs cellulaires essentiels. Tous les organismes vivants en contiennent une grande partie. [12]

Les protéines sont formés par des enchaînements d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. [3]

Il n'y a pas de limite supérieure à la taille d'une protéine. On en connaît dont le poids moléculaire dépasse le million. [4]

2. Rôle des protéines dans les organismes vivants :

La fonction principale des protéines est de représenter des constituants essentiels du matériel structural. Un apport adéquat de protéines est essentiel pour les animaux supérieurs puisque seuls les organismes inférieurs sont capables de synthétiser leurs protéines à partir d'autres sources d'azote. En outre, un certain nombre de protéines possèdent un rôle physiologique spécifique important. Citons par exemple les protéines présentant des propriétés hormonales : l'insuline, le glucagon, la gastrine, etc. Notons aussi que toutes les enzymes sont des protéines. [13]

3. Les protéines d'organismes unicellulaires :

Comme nous l'avons fait remarquer en introduction, les protéines d'organismes unicellulaires, POU, sont une réelle solution au grave problème de déficit protéique dans le monde. En effet, il est possible aujourd'hui de produire à l'échelle industrielle des protéines à partir de microorganismes. Les amidons, le saccharose de mélasse ou le lactose du lactosérum peuvent être utilisés comme substrats de fermentation. Les hydrocarbures sont susceptibles d'être un substrat pour de nombreuses levures et divers champignons filamenteux [1]. En fait les possibilités sont nombreuses et le tableau 1 nous donne une idée de l'intérêt à développer ces nouvelles sources de protéines.

Organisme (1000 kg)	Protéine produite par jour en kg	Rendement journalier en %
Boeuf	1	0,1
Soja	10	1
Levures	10^5	10^4
Bactéries	10^{11}	10^{10}

Tableau 1: Rendement journalier en protéines synthétisées par divers organismes vivants.[1]

On peut distinguer les protéines microbiennes provenant des bactéries, des levures, des champignons filamenteux et des algues. Pour notre part nous allons nous intéresser aux protéines des levures.

4. Les levures :

4.1 Caractères principaux et classification des levures :

Les levures et moisissures font partie du vaste ensemble des champignons [4].

Les levures sont considérées comme une collection de microorganismes appartenant aux trois classes de champignons supérieurs (Ascomycètes, Basidiomycètes, Deutéromycètes) et qui ayant perdu leur organisation cénocytique, sont devenus unicellulaires. [14]

a- Morphologie :

Les levures très répandues dans la nature, sont de forme ellipsoïdale ou sphérique [15]. Il existe cependant, une grande diversité dans les aspects morphologiques. [14]

La levure typique est une cellule ovulaire dont la taille peut varier de 1 à 5 μm en largeur et de 5 à 50 μm en longueur. Elle ne possède pas de flagelle et est donc immobile [14]

b- Cytologie :

Les levures sont des Eucaryotes et possèdent donc un noyau distinct et des organites sub-cellulaires tels que réticulum endoplasmique et mitochondries (figure 2) [16].

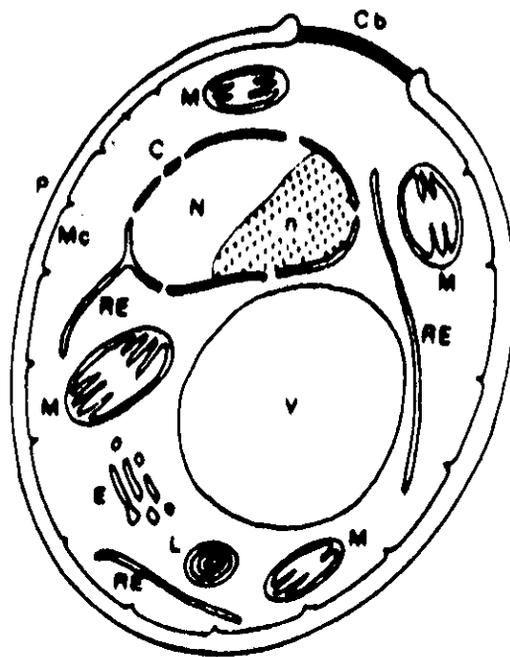


Figure 2 : Schéma structural d'une cellule de levure [16]

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| C : Centriole | Mc: Membrane cytoplasmique |
| Cb: Cicatrice de bourgeonnement | N : Noyau |
| E : Ergastoplasme | n : nucléole |
| L : Liposome | P : Paroi |
| M : Mitochondrie | RE: Réticulum endoplasmique |
| | V : Vacuole |

c- Classification

Les levures forment un groupe hétérogène qui, d'un point de vue taxonomique, comprend 60 genres et 500 espèces (KREGER-VAN-RIJ, 1984) [16]

Ascomycotina

1) Famille Endomycetaceae
Genre *Eremascus*, *Endomyces*

2) Famille Saccharomycetaceae
Sous famille :

- Schizosaccharomycetoideae : *Schizosaccharomyces*
- Saccharomycetoideae: *Saccharomycopsis* (= *Endomycopsis*), *Arthroascus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Schwanniomyces*, *Debariomyces*, *Citromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Pachysolen*, *Lodderomyces*, *Wingea*, *Wickerhamiella*.
- Nadsonioideae : *Nadsonia*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Wickerhamia*.
- Lipomycetoideae : *Lipomyces*

3) Famille Spermophthoraceae
Metschnikowia, Nematospora, Coccidiascus, Ashbya, Eremothecium.

Basidiomycotina
Leucosporidium, Rhodosporidium, Filobasidium, Eilobasidiella, Aessosporon, Sporidiobolus.

Deuteromycotina

1) Famille Sporobolomycetaceae
Sporobolomyces, Bullera.

2) Famille Cryptococcaceae
Cryptococcus, Rhodotorula, Phaffia, Pityrosporum, Schizoblastoporon, Kloeckera, Trigonopsis, Brettanomyces, Torulopsis, Candida, Trichosporon, Oosporidium, Sterigmatomyces, Sympodiomyces

Les organismes suivants sont proches des Levures : *Aureobasidium (=Pullularia), Geotrichum, Taphrina, Prototheca* (algue incolore).

4.2 Physiologie :

a- Reproduction

Les levures peuvent présenter deux modes de reproduction : végétative et sexuée [4].

b- Nutrition

Largement distribuées dans la nature, les levures se rencontrent fréquemment dans le sol ou dans l'air. Les milieux fortement concentrés en sucres représentent un de leurs environnements préférés : tels sont les sirops, le miel, les fleurs, de nombreux fruits comme les pommes, les raisins, les prunes [14]

Un milieu de culture doit être à la fois, une source d'énergie, une source d'aliments (carbone, azote, éléments minéraux, vitamines) et aussi une source d'oxygène dans le cas des fermentations aérobies.

- **Source d'énergie** : Dans les industries de fermentation, les sources d'énergie les plus utilisées et les moins chères sont les amidons et les mélasses [15].

- **Source d'azote** : Parmi les sources d'azote minéral, les sels d'ammonium donnent les meilleurs résultats. Les sources d'azote organique donnent une meilleure croissance mais sont plus coûteuses. Les plus utilisées sont les farines de soja, d'arachide, de viande ou de poisson, l'extrait de malt, l'extrait de levure, le

lactosérum, la caséine ainsi que les extraits enzymatiques de divers produits naturels riches en protéines. L'urée est utilisée par beaucoup de levures et donne des croissances identiques à celles obtenues avec des sels d'ammoniaque [15] et [16].

- **Les éléments minéraux** : Le tableau 2 donne les principaux éléments nécessaires à la croissance cellulaire et leurs fonctions physiologiques.

- **L'oxygène** : Les levures peuvent se développer soit en présence, soit en absence d'oxygène, néanmoins la présence de celui-ci augmente le rendement de la fermentation.

- **Les vitamines** : Le comportement des levures vis-à-vis des vitamines est variable suivant les espèces et même suivant les souches.

Kluyveromyces fragilis a besoin de *niacine* [17]

Élément	Fonction physico-chimique
Hydrogène	Constituant de l'eau et des composants de la cellule. Donneur d'électrons
Carbone	Constituant des composants cellulaires. Donneur d'électrons (respiration) Accepteur d'électrons (fermentation)
Azote	Constituant des protéines, des enzymes et des acides nucléiques. Donneur d'électrons (bactéries nitrifiantes) Accepteur d'électrons (bactéries dénitrifiantes)
Oxygène	Constituant de l'eau Accepteur d'électrons dans la respiration aérobie.
Soufre	Constituant des protéines et du coenzyme A. Donneur et accepteur d'électrons chez les sulfobactéries.
Phosphore	Constituant des acides nucléiques, des phospholipides et de certains coenzymes Formation de l'ATP.
Magnésium	Cofacteur de réactions enzymatiques (ATP). Liaison des enzymes aux substrats.
Fer	Constituant des cytochromes. Cofacteur de réactions enzymatiques.
Potassium Manganèse Calcium Cobalt Cuivre Molybdène Zinc	Cofacteurs ou constituants de certaines enzymes

TABLEAU 2: Fonctions physiologiques des principaux éléments constitutifs des cellules microbiennes [15]

4.3 Rôle et utilisation des levures par l'homme :

L'homme utilise les levures depuis des siècles pour la fabrication des boissons alcooliques comme le vin ou la bière [14]. Un certain nombre de procédés de fermentation et de produits qui en sont issus reposent sur l'utilisation des levures. A la suite de REED (1981) et PEPPLER (1983), on peut les regrouper en sept catégories :

- levures de boulangerie et produits de panification ;
- levures de brasserie et bières ;
- levures de vinification et vins ;
- levures de distillation et spiritueux ;
- levures-aliments ;
- produits dérivés des levures (autolysats, etc) ;
- éthanol industriel et carburant [16]

L'intérêt de leur étude s'est considérablement accru depuis qu'on les sait capables de synthétiser des vitamines et des enzymes. [14].

Les procédés de fermentation qui reposent sur l'utilisation des levures mettent en jeu surtout trois espèces: *Saccharomyces cerevisiae* (brasserie, vinification, distillerie, panification), *Candida utilis* et *Kluyveromyces fragilis* (levure -aliment). Plusieurs autres espèces sont rencontrées en vinification (LAFON - LAFOURCADE, 1983) [16].

4.4 Les levures lactiques

a- Définition

Les levures lactiques appartiennent à la classe des ascomycètes et utilisent le lactose comme source d'hydrate de carbone. Elles se différencient des autres levures par :

- La structure des matières grasses qui les composent et qui sont identiques à celles du lait;
- La composition des membranes qui comprend des corps facilement digestibles (galactomannane et glucogalactone) ;
- La teneur élevée en protéines et en glutathion ;
- La teneur élevée en vitamines [18].

b- Critères de choix des levures en industrie :

Le choix des levures lactiques pour la production de biomasse est basé sur les critères suivants :

- Domination de la souche pour produire des protéines ;
- Résistance de la souche aux métabolites ;

- Résistance de la souche aux changements des conditions de culture ;
- Teneur maximale en acides aminés indispensables et en vitamines ;
- Dimension et forme de la souche ;
- Croissance rapide sur un substrat peu coûteux [19]

c- Composition biochimique

Les tableaux de 3 à 7 donnent respectivement la composition biochimique globale des levures lactiques ainsi que les teneurs en acides aminés, vitamines, glucides et acides gras.

Humidité	4,5
Matière protéique (N x 6,25) (dont A.R.N + A.D.N = 6)	50,0
Glucides	30,3
Lipides	6,0
Minéraux	8,1
Choline	0,5
Glutathion	0,5
Vitamines du groupe B	0,07
Vitamine C	0,006

Tableau 3 : Composition moyenne globale de la levure lactique (g/100g) [20]

Acide aspartique + asparagine	4,3
<u>Thréonine</u>	2,2
Sérine	2,6
Acide glutamique + glutamine	8,3
Proline	1,5
Glycine	1,9
<u>Cystine + cysteine</u>	0,5
Valine	2,2
<u>Méthionine</u>	0,8
<u>Isoleucine</u>	2,0
<u>Leucine</u>	3,3
Tyrosine	1,5
<u>Phénylalanine</u>	1,5
Histidine	1,0
<u>Lysine</u>	3,5
Arginine	2,5
<u>Tryptophane</u>	0,6

Valeurs moyenne pour la levure "Protibel", les acides aminés essentiels sont soulignés.

Tableau 4 : Composition en acides aminés de la levure lactique (g/100g) [21]

Vitamines	Teneurs en mg/100 g de (M.S)*
Vitamines hydrosolubles :	
- B ₁ (Thiamine)	1,0 à 1,5
- B ₂ (Riboflavine)	2,5 à 5,0
- B ₃ ou PP (Nicotinamide)	35,0 à 45,0
- B ₅ (Ac. pantothenique)	8,0 à 15,0
- B ₆ (pyrodixine)	0,8 à 15,0
- B ₈ ou H (Biotine)	0,04 à 0,09
- B (ac. folique)	1,8 à 2,0
- B ₁₂ (cobolamine)	0,0005 à 0,0015
- C (ac. ascorbique vrai)	65,0 à 75,0
Vitamine liposolubles :	
- E (Tocopherol)	25,0 à 45,0

Tableau 5 : Fraction vitaminique de la levure lactique [21]

Glucides	Teneurs en g/100 g de (M.S)
- Glucose + Fructose + galactose	0,250
- Mesoinositol	0,005
- Glycogène	5,000
- Galactomannanes	6,000
- Glucogalactanes	14,000
- Glucomannanes	5,000

Tableau 6 : Fraction glucidique de la levure lactique [21]

Acides gras	Teneurs en mg/100 g de (M.S)
- Butyrique C ₄	10
- Lauryque C ₁₂	05
- Myriétique C ₁₄	30
- Pentaheconoïque C ₁₅	20
- Palmitique C ₁₆	575
- Palmitoleïque C ₁₆	180
- Heptaodécanoïque C ₁₇	50
- Stearique C ₁₈	85
- Oleïque C ₁₈	985
- Linoléïque C ₁₈	705
- Linolénoïque C ₁₈	250
- Arachidonique C ₂₀	05
- Gadoleïque C ₂₀	05

Tableau 7 : Répartition des acides gras dans la levure lactique [21]

* M.S = Matière Sèche

d- Propriétés organoleptiques:

La levure lactique se caractérise par une couleur beige et une faible saveur "SUI Generis" sans amertume. Cette saveur destine la levure lactique aux nutriments salés où elle pourra être quantitativement beaucoup plus représentée que dans les aliments sucrés. [22] et [23]

e- Intérêt nutritionnel:

La valeur diététique des levures lactiques est reconnue en alimentation humaine et animale (MOULIN et Coll, 1976). En effet, elles sont riches en protéines, présentent une teneur élevée en lysine et ont une teneur normale en tryptophane. Leur faible teneur en acides aminés soufrés méthionine et cystéine nécessitent un ajout de la D,L-méthionine de synthèse ou de lui associer des protéines végétales.

Les levures lactiques sont aussi particulièrement riches en vitamines du groupe B liées à une présence importante de glutathion, d'acides ascorbique et galactomannanes qui facilitent le transit intestinal. [24]

Les teneurs élevées en acides linoléiques et linoléique, acides gras essentiels des familles (n-6) et (n-3), indispensables pour le développement normal de l'organisme (JOYCE, 1987), sont un facteur déterminant pour l'utilisation des levures lactiques dans l'alimentation.

Certains auteurs estiment que les levures contiennent, en plus des constituants classiques, d'autres facteurs de croissance non encore identifiés (MOREL et Coll, 1979). [25]

f- Aspects toxicologique et hygiénique :

Parfois un aliment, bien qu'il soit indemne de toute contamination, peut être nuisible par lui-même à notre organisme: réactions d'allergie et d'intolérance.

Ainsi tout aliment non conventionnel, notamment lorsqu'il s'agit des protéines d'organismes unicellulaires, doit être soumis à des tests toxicologiques.

Dans le cas de la biomasse microbienne, le premier obstacle à son utilisation est la teneur élevée en acides nucléiques. En effet, un taux d'acides nucléiques supérieur à 10% peut provoquer chez l'organisme humain des troubles métaboliques.

En général, une consommation excessive de levure lactique conduit à une augmentation du taux d'acide urique dans l'organisme.

En outre, pour préserver la qualité alimentaire de la levure, il convient de stabiliser strictement le taux lipidique des cellules.

Il est donc nécessaire de prévoir des modes de conservation appropriés, entre autres l'emploi d'anti-oxydants. [25]

Le débouché traditionnel a longtemps consisté en la reprise du lactosérum par les fournisseurs du lait, ils l'utilisaient soit en alimentation du bétail, soit comme engrais. Les quantités non utilisées étaient rejetées comme eaux résiduaires.

Ces dernières années, plusieurs facteurs ont rendu difficile la restitution du lactosérum et un recul de ses utilisations classiques :

- L'augmentation de la production laitière et par conséquent du lactosérum ;
- La concentration industrielle (a modifié la répartition des quantités disponibles de lactosérum) ;
- La distance entre l'exploitation laitière et la laiterie plus grande ;
- La reconversion des techniques d'alimentation du bétail et de fumure ;
- La modification de la législation relative à la pollution des cours d'eau.

1. Valorisation du lactosérum :

Par souci d'économie, on a d'abord songé à concentrer le lactosérum à l'état de poudre. [6]

La tendance actuelle est d'extraire les lactoprotéines, ce qui diminuerait les importations de tourteau de soja, constituant l'élément protéique conventionnel. Restera ensuite à valoriser les jus lactosés, résidus des traitements d'extraction.

1.1 Extraction des lactoprotéines :

Les protéines peuvent être extraites de différentes manières : Filtration sur gel, thermocoagulation des sérums, extraction en milieu acide (BEL - INDUSTRIE), ultrafiltration, adsorption sélective sur échangeurs d'ions.

1.2 Traitement des jus lactosés : plusieurs types de traitement ont été proposés :

- Dégradation du lactose par des levures lactiques Saccharomyces (procédé BEL et DEVOS).

- Extraction avec raffinage du lactose pur ou hydrolyse enzymatique en vue d'obtenir des aldohexoses (glucose - galactose) au pouvoir sucrant plus élevé (miel de lait).

- Fermentation alcoolique et Cristallisation du lactose [26]

2. Le lactosérum dans l'alimentation humaine :

Les domaines d'utilisation particulièrement étudiés sont: l'alimentation infantile (substitut du lait humain), les boissons ("Soft drinks"), les produits laitiers (fromages et yaourts), les crèmes glacées et la production de biomasse (levures en particulier). [6]

3. Le Lactosérum dans l'alimentation animale :

Les applications les plus étudiées ont été l'alimentation des porcs, du cheptel laitier et des veaux. Des essais ont également été effectués sur les ovins et la volaille.

Le lactosérum est donné aux animaux sous forme liquide, en poudre ou concentré, sous forme de blocs. [6]

4. Produits de fermentation à partir du lactosérum:

La présence en proportion importante de lactose, fait du lactosérum une source de carbone qui convient particulièrement à la culture des levures. [20]

4.1 Production de levures :

De nombreux travaux ont été effectués sur la culture de *Saccharomyces fragilis* dans le but d'optimiser la production de biomasse, soit de protéines. Les fromageries BEL sont un exemple de l'application de ces procédés de fermentation. La culture de quatre levures, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, est réalisée dans des surnageants de lactosérums doux ou acides. La comparaison de différentes espèces de *Kluyveromyces* : *Kl. marxianus*, *Kl. lactis* et *Kl. fragilis*, montre que la plus forte production de protéines (0,17 mg/mg de lactose) est obtenue avec *Kl. fragilis*. [6]

4.2 Production de vitamines :

Eremothecium ashbyii semble produire des quantités relativement importantes de riboflavine (vitamine B₂) quand il est cultivé sur du lactosérum : 0,200 mg de riboflavine par ml de sérum.

4.3 Production d'enzymes :

- La β -galactosidase (lactase) a une importance potentielle pour l'industrie laitière. Une source potentielle de l'enzyme est *Saccharomyces fragilis*.

- KANN et Coll, 1973 ont décrit la production d'enzymes protéolytiques et amylolytiques par *Aspergillus oryzae* sur milieu de lactosérum.

- La biosynthèse de pectinase et de cellulase par des microorganismes, se révèle être plus importante dans du lactosérum frais que dans les substrats basés respectivement sur la pectine ou la cellulose.

4.4 Production de matières grasses :

La réduction de la DCO par fermentation, avec production d'huile comestible est un moyen intéressant d'utilisation du lactosérum.

4.5 Production d'acide lactique et de lactates :

- Lactate de calcium obtenu par fermentation de mélasses de lactosérum par *Lactobacillus acidophilus* (HALLATKO et KNEZ, 1959).

- Acide lactique de haute qualité obtenu sur lactosérum doux avec 4 souches de *Lactobacillus bulgaricus* et une souche de *Lactobacillus lactis* (SURAZYNSKI et Coll, 1974). [6]

5. Production de levures lactiques par le procédé BEL* :

5.1 Bref historique

La culture de levures en fermentation continue sur lactosérum a commencé aux FROMAGERIES BEL en 1950, époque à laquelle bien peu de chercheurs pensaient à la production de levure-aliment. La première levurerie a été opérationnelle en 1956.

5.2 Produits que l'on cherche à obtenir:

L'objectif est de produire des levures-aliment destinées à l'alimentation humaine et animale, telles qu'elles ont été définies par les normes des directives de la C.E.E. [27]

* (Brevet n° 1.128.063 déposé le 22 Juin 1955)

5.3 Procédé de fabrication :

Principe : Le lactosérum, après déprotéinisation, est utilisé industriellement, comme milieu nutritif pour cultiver en quantité maximale la levure *Saccharomyces fragilis*, appelée maintenant *Kluyveromyces fragilis*.

Le procédé se fait donc en deux opérations:

a- Extraction des protéines : (Annexe I)

Le lactosérum frais est d'abord soumis à l'extraction des lactoprotéines. En effet, les protéines complexes du lactosérum, lactalbumine, lactoglobuline, ne sont pas assimilables par les levures.

Une séparation basée sur le phénomène de dénaturation par voies acide et thermique, permet de récupérer 75% des matières protéiques du sérum (BLANCHET ET BIJU-DUVAL, 1969)

Le rendement global est de 4 kg environ de produit sec par mètre cube de sérum brut. La poudre est obtenue par séchage d'une pâte de lactoprotéines, titrant 20 à 30% de matière sèche totale ; elle a la composition schématique suivante (GAC et Coll, 1975) :

Humidité	6%
Sels minéraux	1,2%
Protéines	72% { 45% lactoglobuline , 20% lactalbumine}
Glucides	12,8%
Matières grasses	8%

b- Valorisation du jus lactosé et déprotéiné par culture de levures aux dépens du lactose : (Annexe II)

Le lactosérum déprotéiné constitue 95 à 98% du volume de sérum traité, et contient en outre, la quasi totalité du lactose et le reste des protéines du sérum. Il est utilisé comme milieu nutritif pour cultiver de façon continue la levure *Saccharomyces fragilis*.

La levure obtenue est séparée du milieu, lavée, filtrée, plasmolysée et séchée. La plasmolyse permet de régulariser la qualité bactériologique du produit, de détruire les lipases, permettant ainsi une meilleure conservation, et d'améliorer la digestibilité des protéines produites.

Le rendement de la fermentation, c'est à dire le poids de levures obtenues à partir d'un poids donné de lactose entrant en fabrication, est de l'ordre de 50 à 53% (BLANCHET ET BIJU-DUVAL, 1969). GAC et Coll, 1975, citent un rendement variant de 16 à 20 kg de levures séchées par mètre cube de sérum. [6]

b. Caractéristiques et qualités des produits obtenus :

La composition globale des levures lactiques est la suivante :

Eau	6%
Sels minéraux	8%
Protéines	47%
Matières grasses	9,2%
Cellulose	4,8%
Autres glucides (par différence)	25%

La composition en acides aminés de cette levure est comparable à celle de la levure de bière ou de la levure de boulangerie, elle se caractérise par une déficience en acides aminés soufrés et une importante teneur de lysine.

La forte teneur en matière grasse et en acides gras insaturés, acides linoléique, de la levure lactique, la distingue des autres levures, et présente un grand intérêt sur le plan alimentaire.

La valeur biologique des levures lactiques, a été établie par de nombreuses recherches entreprises par le CNRZ*.

L'une de ces études rapporte que la levure lactique, incorporée à une ration pour rats à base d'arachide et de gluten, provoque une augmentation de croissance de 100%, alors que la levure de bière n'augmente la croissance que de 50% (CALET et Coll, 1962). Une autre étude, effectuée sur des veaux, a montré que des lacto-remplaceurs contenant des levures lactiques permettraient d'obtenir un pain journalier de poids de 1,14 kg (1,01 kg avec *Torula* dans les lacto-remplaceurs) et un rendement de viande de 63,57% (60,67% avec *Torula*) (BLANCHET ET BIJU-DUVAL, 1969)

De nombreux essais ont été réalisés en diététique humaine, ils ont montré que les apports de levure dans l'alimentation amélioreraient toujours l'état général des utilisateurs et activaient la croissance lorsqu'il s'agissait d'enfants ou d'adolescents. [6]

6. Le procédé WASSERMAN :

A titre d'exemple, on décrira un des procédés Wassermann. Il permettra de préciser les principaux problèmes posés par ces fermentations.

Il est nécessaire que le sérum utilisé ne contienne pas trop de matières grasses qui peuvent être gênantes au moment du séchage final. Le milieu doit être supplémenté avec 0,225% de phosphore et de l'azote.

* Centre National de la Recherche Zootechnique, France.

On peut aussi ajouter 0,85% de sulfate d'ammonium. Le pH optimum se situe aux environs de 5 à 5,7. S'il s'élève trop, on peut soit ajouter de l'acide, soit supprimer l'aération de telle sorte que les levures en anaérobie synthétisent de l'acide. La température optimum se situe vers 30-32°C, et on peut même atteindre 40°C. La culture est exothermique, et le refroidissement du fermenteur est quelques fois nécessaire.

La vitesse d'obtention du rendement limite dépend de l'ensemencement. On obtient un même rendement en 8 heures pour un inoculum de 3,5 g/l, qu'en 3 à 4 heures avec 23,8 g/l.

On considère que 35% du lactose est dégradé à des fins énergétiques par la biomasse, le reste, 65% étant utilisé pour la croissance, sous réserve que la quantité d'oxygène soit suffisante.

La suspension de levure est centrifugée et on obtient un crème contenant 15 à 18% de matière sèche. Les levures peuvent être lavées et séchées sur rouleaux ou en spray et broyées. [6]

7. La valorisation du lactosérum en Algérie :

L'industrie laitière algérienne était à partir de 1969 représentée sur tout le territoire national par l'Office National du LAIT (ONALAIT).

Après la restructuration de 1982, celui-ci se divisa en plusieurs offices régionaux. Ainsi naquit dans chaque région un office autonome :

- ORLAC au centre ;
- ORELAIT à l'est ;
- OROLAIT à l'ouest.

La capacité de production des fromageries algériennes exprimées en litres de lait mis en oeuvre par jour est actuellement de :

- 33 000 litres pour la région ouest ;
- 155 000 litres pour le centre ;
- 30 000 litres pour l'est. [28]

Le problème de la valorisation du lactosérum qui en résultait n'a pas suscité l'intérêt des organismes concernés, et le sous-produit de ces fromageries était entièrement rejeté à l'égout.

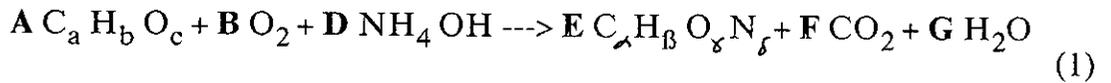
En 1984, une décision de la direction générale de l'ORLAC proposait l'utilisation de ce lactosérum, du moins une partie, en l'incorporant au lait pasteurisé et au lait fermenté pasteurisé.

Plus tard, une incorporation du lactosérum dans l'alimentation du bétail fût également tentée. [29]

1. Bilan chimique de la croissance microbienne :

La croissance microbienne peut être considérée comme un ensemble de réactions chimiques en chaîne, conduisant à la synthèse de constituants de la biomasse microbienne. Globalement le processus obéit au principe de conservation de la matière.

Dans le cas où la biomasse est le seul produit formé, le phénomène de la croissance se traduit par la réaction chimique suivante:



$C_a H_b O_c$ désigne le *Substrat organique* de masse molaire M.

$C_x H_\beta O_\gamma N_\delta$ correspond à la formule brute de la matière sèche cellulaire. Cependant, cette formule ne correspond qu'à 90% de la biomasse microbienne. La composition centésimale de la biomasse obtenue varie avec le type de souche cultivé et avec la composition du milieu de culture.

WANG et Coll. (1979) proposent la formule brute $C_6 H_{11} O_3 N$ pour une biomasse de levure. On peut également retenir $C_6 H_{10} O_3 N$ ou $C_5 H_7 O_2 N$ ou de façon plus précise $C_6 H_{10,9} O_{3,06} N_{1,03}$. Pour une biomasse bactérienne, HUMPHREY (1968) propose $C_{4,41} H_{7,3} O_{1,19} N_{0,86}$

La relation (1) permet d'aborder la formulation des milieux et de définir les conditions de culture.

Le substrat $C_a H_b O_c$ joue deux rôles dans le processus global : il fournit l'énergie nécessaire aux réactions de synthèse et de maintenance, et sert à l'édification des constituants cellulaires.

La proportion du substrat servant à l'une ou l'autre fonction apparaît dans l'évaluation du coefficient de conversion du substrat $Y_{X/S}$, quantité de biomasse produite (en grammes) par gramme de substrat dégradé.

Le bilan chimique de la relation (1) permet, connaissant $Y_{X/S}$ recherché, d'évaluer la quantité d'azote nécessaire à l'opération et de calculer la quantité d'oxygène (demande en oxygène) nécessaire.

MATELES (1971) propose la relation suivante :

$$O_x = 16 \left[\frac{2a+(b/2)-c}{Y_{X/S} \cdot M} + \frac{O'}{1600} - \frac{C'}{600} - \frac{H'}{200} + \frac{N'}{933} \right] \quad (2)$$

où O_x est la demande en oxygène ($g O_2 / g$ biomasse produite) et O' , C', H', et N' les pourcentages respectivement en oxygène, carbone, hydrogène, azote de la biomasse produite.

Il apparaît que la demande en oxygène est inversement proportionnelle au coefficient de conversion $Y_{X/S}$.

2. La courbe de croissance microbienne:

La croissance des microorganismes est limitée. Après 16 à 24 heures de culture, elle s'arrête. Le milieu finit par s'épuiser. C'est ce que l'on appelle la croissance en milieu non renouvelé.

Les techniques d'évaluation d'une population microbienne permettent de suivre l'évolution de la concentration microbienne X (g de matières sèches cellulaire/l) en fonction du temps.

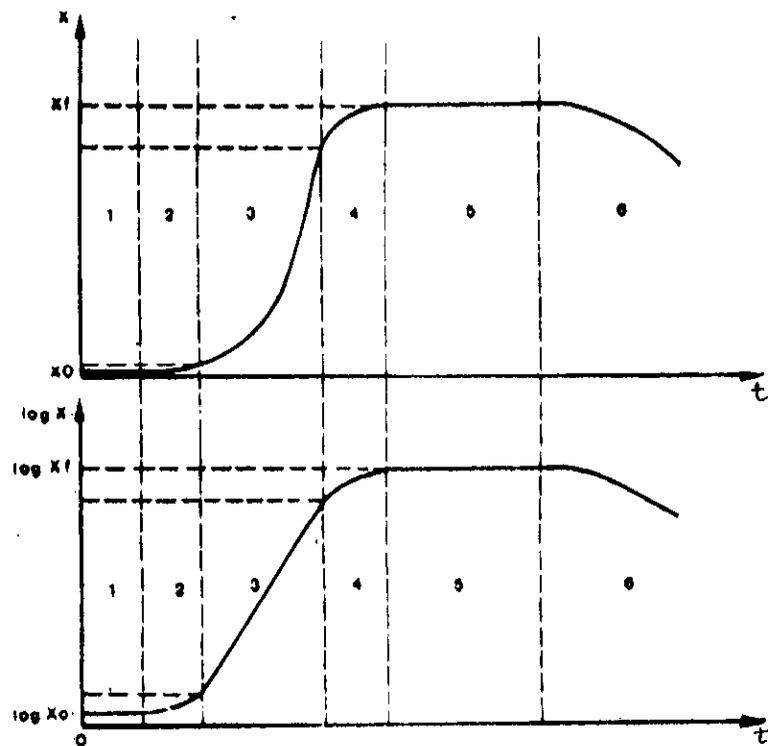


Figure 3 : Courbe de croissance $X=f(t)$ et $\log X = f(t)$

Dans tous les cas on obtient les allures des courbes de la figure 3. On distingue les différentes phases suivantes:

- **La phase de latence (1)**, où il n'y a pas de reproduction cellulaire.
 $X = cte = X_0$ (3)

Il s'agit d'une période d'adaptation au milieu.

la vitesse de croissance (g/l.h) est nulle :

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (4)$$

La vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance (h^{-1}) est nulle:

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \mu = 0 \quad (5)$$

- **La phase d'accélération (2)**, au cours de laquelle la reproduction cellulaire commence. X augmente lentement puis plus rapidement ;

- **La phase exponentielle (3)**, la vitesse de croissance augmente proportionnellement à X. μ est constant et maximal.

$$\text{On a } \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{X} = \mu_{\max} \quad (6)$$

$$\text{et } \log X_2 - \log X_1 = \mu_{\max} (t_2 - t_1) \quad (7)$$

$$X_2 = X_1 \cdot e^{\mu_{\max} (t_2 - t_1)} \quad (8)$$

- **La phase de ralentissement (4)**, la courbe présente un point d'inflexion, dû à l'épuisement du milieu de culture et souvent à l'accumulation de produits inhibiteurs. Après le point d'inflexion X continue d'augmenter mais dX/dt et μ diminuent.

- **La phase stationnaire (5)**, X atteint sa valeur maximale X_f . La croissance s'arrête. Les cellules conservent une activité métabolique.

- **La phase de déclin (6)**, le taux de mortalité augmente et X décroît dans le temps.

L'étude de croissance microbienne permet de déduire tout d'abord la valeur de $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (9)$$

La concentration résiduelle en substrat S étant généralement voisine de 0, on la néglige par rapport à S_0 .

On peut aussi définir la productivité maximale (figure 4).

$$P_m = \frac{X_m}{t_m} \quad (10)$$

et la productivité totale :

$$P_T = \frac{X_f}{t_M} \quad (11)$$

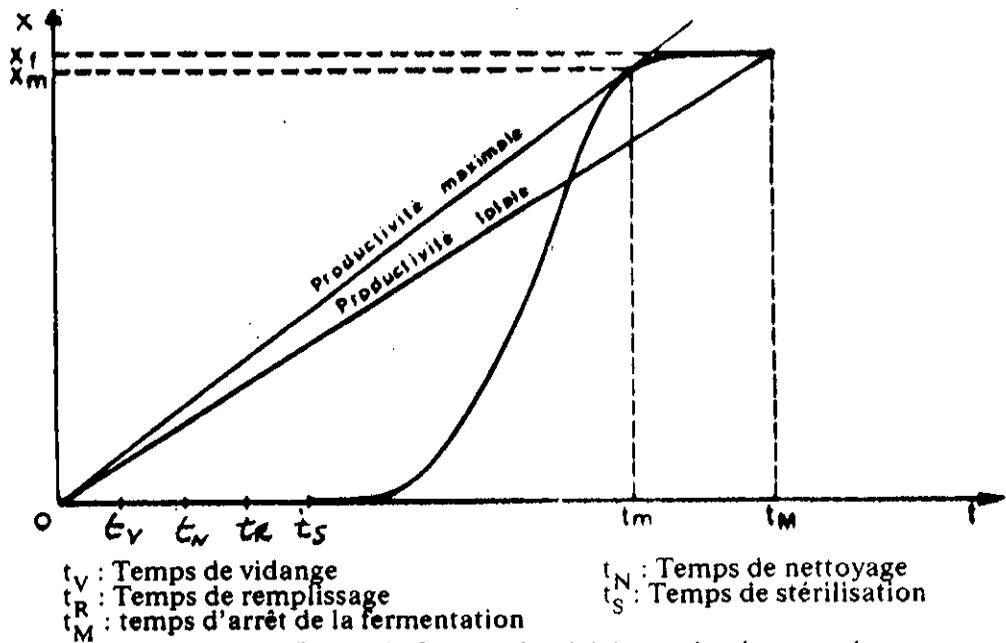


Figure 4 : Les productivités maximale et totale

3. Influence de la concentration en substrat sur la croissance microbienne :

Au cours de la phase exponentielle de croissance, il est clair que μ est indépendant de la concentration du milieu S. Au dessous d'une certaine concentration S' , ce n'est plus vrai. La croissance ne peut pas avoir lieu et le taux de croissance demeure inférieur au taux de croissance maximal. (figure 5). Le taux de croissance augmente avec S et est égal à μ_{max} pour toutes les concentrations supérieures à S' .

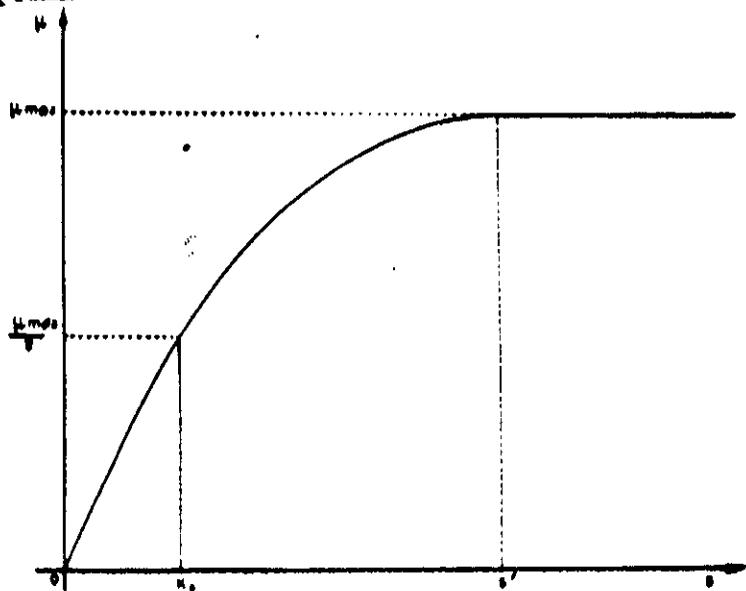


Figure 5 : Evolution du taux de croissance en fonction de la concentration en substrat

MONOD (1949) propose d'exprimer μ en fonction de S par la relation empirique suivante, déduite, par analogie, de l'équation établie par MICHAELIS pour les enzymes:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (12)$$

K_s est la concentration pour laquelle $\mu = \mu_{\max}/2$. La valeur de K_s varie d'une souche microbienne à l'autre et selon le facteur chimique envisagé. [5] et [30]

Le tableau 1 reporte quelques valeurs caractéristiques de K_s .

Substrat	K_s (mg/l)	Microorganisme
Glucose	2-4	<i>Escherichia coli</i>
Glucose	25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Méthanol	120	<i>Hansenula polymorpha</i>
Ammoniaque	0,1	<i>Enterobacter aerogenes</i>

Tableau 1 : Quelques valeurs caractéristiques de K_s [30]

1. Introduction : Qu'est ce que la modélisation?

La croissance microbienne est un phénomène très complexe, par le nombre et le type des réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis des facteurs extérieurs.

Jusqu'en 1960, environ, la maîtrise de phénomènes microbiens était affaire d'habileté, d'expérience et d'intuition. Il fallait beaucoup de temps et d'argent pour arriver à définir les conditions optimales de croissance d'un microorganisme. Aujourd'hui, grâce à l'apparition des calculateurs, on peut appliquer des méthodes mathématiques et statistiques à l'étude des phénomènes et arriver à les maîtriser et à les exploiter.

A partir de résultats expérimentaux, une équation mathématique est établie, traduisant de façon concise et précise le phénomène que l'on veut analyser. Cette équation peut être complexe et faire intervenir tous les paramètres que l'on souhaite étudier. On teste ensuite la validité du modèle. Disposant d'un modèle correct, par traitement mathématique, on peut rechercher les conditions de conduite optimale du phénomène selon tel ou tel critère retenu (*optimisation*). On peut de plus prévoir le résultat d'un essai sans pour autant le réaliser (*simulation*).

2. Quelques types de modèles mathématiques de croissance microbienne

L'étude de la croissance microbienne peut être conduite comme celle d'un "système" constitué de deux phases :

- Une phase vivante (biotique), correspond à la population cellulaire ;
- Une phase non vivante (abiotique) constituée de l'environnement physico-chimique immédiat des cellules. Contrairement à la première, cette phase est caractérisée par des paramètres maîtrisables.

Parmi les différents types de modèles existant nous citerons les modèles déterministes et descriptifs.

2.1 Modèles déterministes

La biomasse cellulaire est dans ce cas considérée globalement. Le modèle décrit alors les variations de sa concentration en fonction du temps.

Cette hypothèse est très souvent appliquée et conduit à des résultats valables.

2.2 Modèles descriptifs

Lorsque les mécanismes biochimiques sont inconnus ou trop nombreux on a recours à décrire l'évolution du système à l'aide d'une fonction mathématique empirique. Le modèle est alors descriptif ou phénoménologique.

3. Quelques modèles de croissance microbienne :

Les modèles déterministes descriptifs sont les plus utilisés. Il s'agit donc de traduire sous forme mathématique la courbe de la croissance (figure. 3), ainsi que l'influence des facteurs extérieurs (pH, température) sur la forme de cette courbe.

3.1 Le modèle de MALTHUS :

C'est le modèle le plus simple, il n'exprime que la phase exponentielle de la courbe de croissance au cours de laquelle la vitesse de croissance est proportionnelle à la quantité de biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (13)$$

3.2. Le modèle de VERHULST :

Au cours du siècle dernier, le mathématicien VERHULST a proposé une loi qui tient compte des trois phases exponentielle, de ralentissement et stationnaire:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - a X) \quad (14)$$

Dans cette équation, a est un paramètre sans signification biologique.

3.3. Modèle de TEISSIER :

En 1936, TEISSIER a établi une autre loi de croissance basée sur le principe de la conservation de la matière. Cela donne :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - e^{-(S/K)}) \quad (15)$$

où K est une constante.

En tenant compte du fait que lorsque $X \rightarrow X_f$, $Y_{X/S} \rightarrow \frac{X_f - X_0}{S_0}$,
la loi peut se mettre sous la forme :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X [1 - e^{a(X-X_f)}] \quad (16)$$

3.4. Modèle d'EDWARDS et WILKE :

En 1968, ils ont proposé une forme générale de la loi logarithmique :

$$\frac{dx}{dt} = X (1 - X / X_f) (a_1 + 2 a_2 t + 3 a_3 t^2 + \dots) \quad (17)$$

Sous sa forme la plus simple, cette loi s'écrit :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X (1 - X / X_f) \quad (18)$$

3.5. Le modèle de MONOD:

C'est sans doute le modèle le plus utilisé. MONOD a retenu empiriquement :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (12)$$

Au cours de la croissance logarithmique :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (13)$$

d'où

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \frac{S}{K_s + S} \quad (19)$$

3.6. Le modèle polynomial :

La loi polynomiale est fréquemment utilisée, parce que la plus générale :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X [1 - (X/X_f)^a] \quad (20)$$

La plupart de ces modèles font intervenir des paramètres (μ et X_f) qu'il faut estimer.

Une loi de croissance ne décrit qu'un seul essai expérimental effectué pour des paramètres maintenus constants. A cet essai correspond une valeur de μ et de X_f

PARTIE EXPERIMENTALE

1. Matériel biologique :

La levure utilisée est une *Kluyveromyces fragilis* isolée au laboratoire de Génétique de l'institut de Biologie de l'USTHB.

Cette souche a été choisie car elle est l'une des plus intéressantes du point de vue production de biomasse sur lactosérum.

2. Les milieux de culture :

2.1 Milieu de conservation :

La souche est conservée en milieu gélosé incliné de Sabouraud à base de glucose dont la composition est la suivante :

Glucose	20 g
Peptone	10 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1 000 ml
pH	5,5

Après ensemencement, les tubes sont portés à incubation à 30°C pendant 24 h.

Pour maintenir la vitalité des cellules, la levure est conservée à +4°C et repiquée tous les mois dans un nouveau milieu.

2.2 Milieu de culture

C'est un milieu synthétique qui réunit tous les éléments nécessaires à la croissance de la souche. On y trouve :

- . une source d'azote ;
- . une source de carbone ;
- . de l'oxygène ;
- . des oligo-éléments ;
- . des facteurs de croissance.

- Composition du milieu [31]:

. Lactose	
. Extraits de levure (contient la <i>niacine</i>)	1 g/l
. KH_2PO_4	2,81 g/l
. NH_4Cl	7,63 g/l
. Solution d'oligo-éléments*	1 ml/l
. Solution de métaux	1 ml/l
. Ammoniaque 4,5 g d'azote par litre soit	24 ml/l

3. Appareillage et produits

Afin de réaliser le montage expérimental (figure 7) et pour la suite de l'expérimentation, nous devons disposer du matériel suivant :

- un minifermentateur de 120 ml
- un agitateur magnétique
- un pH-mètre
- un bain-marie
- un spectrophotomètre (MILTON ROY-SPECTRONIC 1201)
- une pompe à air munie d'un diffuseur
- une pompe à reflux
- une centrifugeuse
- une étuve réglée à 105°C
- un réfrigérant
- un filtre à air
- un thermomètre
- plusieurs pipettes de différents volumes
- une burette
- un bec benzène
- une anse à ensemençer
- de la verrerie diverse (béciers, erlens, ..)
- Produits :
 - . Eau distillée
 - . NaOH 0,2 N
 - . HCl (35%)
 - . Ammoniaque (25%)
 - . Eau oxygénée
 - . Eau de Javel

* Les compositions des solutions d'oligo-éléments et de métaux sont en annexe VI

1. Protocole complet de la fermentation

1.1 Préparation du milieu

Le lactose et l'extrait de levure sont ajoutés au milieu juste avant son utilisation.

On prépare 150 ml de milieu dont 20 ml sont destinés à la préculture et 120 ml à la culture.

On ajuste le pH du milieu à 3 à l'aide d'acide chlorhydrique (35%).

1.2 Stérilisation :

Le pH 3 a été choisi afin de réduire les risques de contaminations par des bactéries. En effet, les bactéries ont un pH optimal situé entre 4 - 8, tandis que les levures croissent favorablement dans la plage de pH de 3 à 6.

Nous avons opté pour une stérilisation à froid du matériel. Toute la verrerie, en particulier celle qui sera en contact avec le milieu de culture est soigneusement lavée à l'eau de Javel puis abondamment rincée à l'eau chaude afin d'ôter toute trace de chlore.

Le thermomètre et l'électrode de pH sont nettoyés à l'eau oxygénée puis rincés à l'eau chaude.

Il est nécessaire de travailler sur une surface propre et stérile, il faut donc veiller à la laver régulièrement avec de l'eau de Javel.

1.3 La préculture :

La souche de levure conservée sur le milieu gélosé de Sabouraud doit être réactivée sur un milieu de préfermentation dont la composition est identique à celle du milieu de fermentation. Cette opération est nécessaire pour réduire la durée de la phase d'adaptation de la souche au milieu de culture, soit un temps de latence plus court.

20 ml de milieu de culture sont introduits dans une fiole d'ermeneyer de 200 ml (soit 1/10 de son volume). Puis à l'aide d'une anse àensemencer on prélève stérilement (devant la flamme) un inoculum à partir du milieu gélosé et on l'introduit dans la fiole. Celle-ci est fermée avec du coton de façon à permettre une bonne aération puis mise à incuber à 35°C sous agitation magnétique pendant 12 heures (figure 6).

Remarque : Comme il nous était difficile de suivre l'évolution de la densité optique du milieu de préculture, la durée de l'incubation a été choisie par tâtonnement.

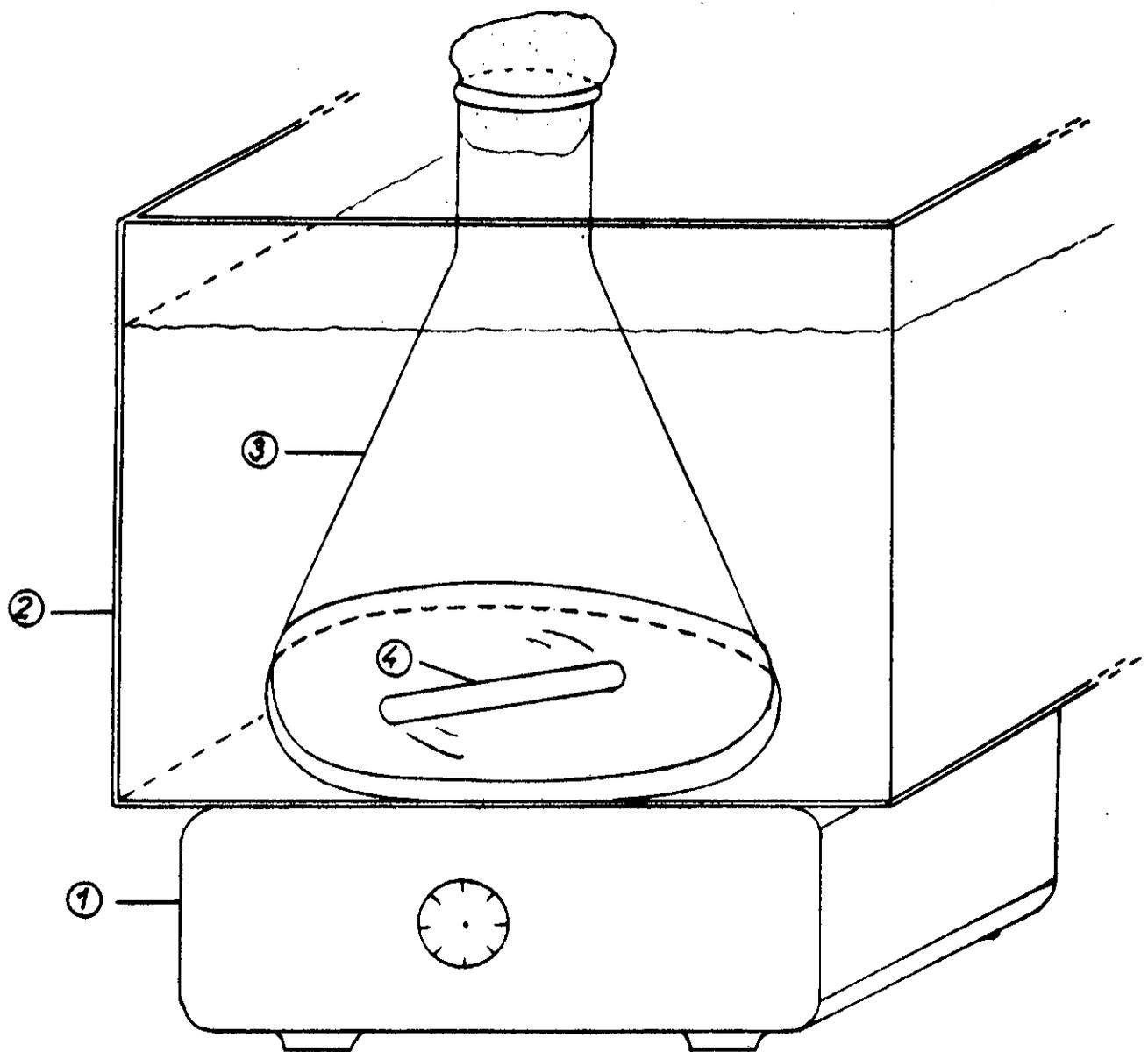


Figure 6 : Préculture en fiole

1 - Agitateur magnétique
3 - Fiole de préculture

2 - Bain marie réglé à 35°C
4 - Barreau magnétique

1.4 La culture

120 ml de milieu sont introduits stérilement dans le fermenteur. On connecte les différents éléments du montage expérimental tel qu'il est schématisé dans la figure-7. On met en marche le bain-marie réglé à 35°C et la pompe de refoulement et lorsque le milieu a atteint la température voulue, on allume les autres appareils : agitateur, pompe à air, pH-mètre. Enfin, on introduit stérilement 12 ml du milieu de préculture dans le fermentateur à raison de 10% environ.

La fermentation étant lancée, nous allons suivre son évolution tout en maintenant le pH constant par ajout de soude 0,2 N. La température doit aussi demeurer constante tout au long de la fermentation.

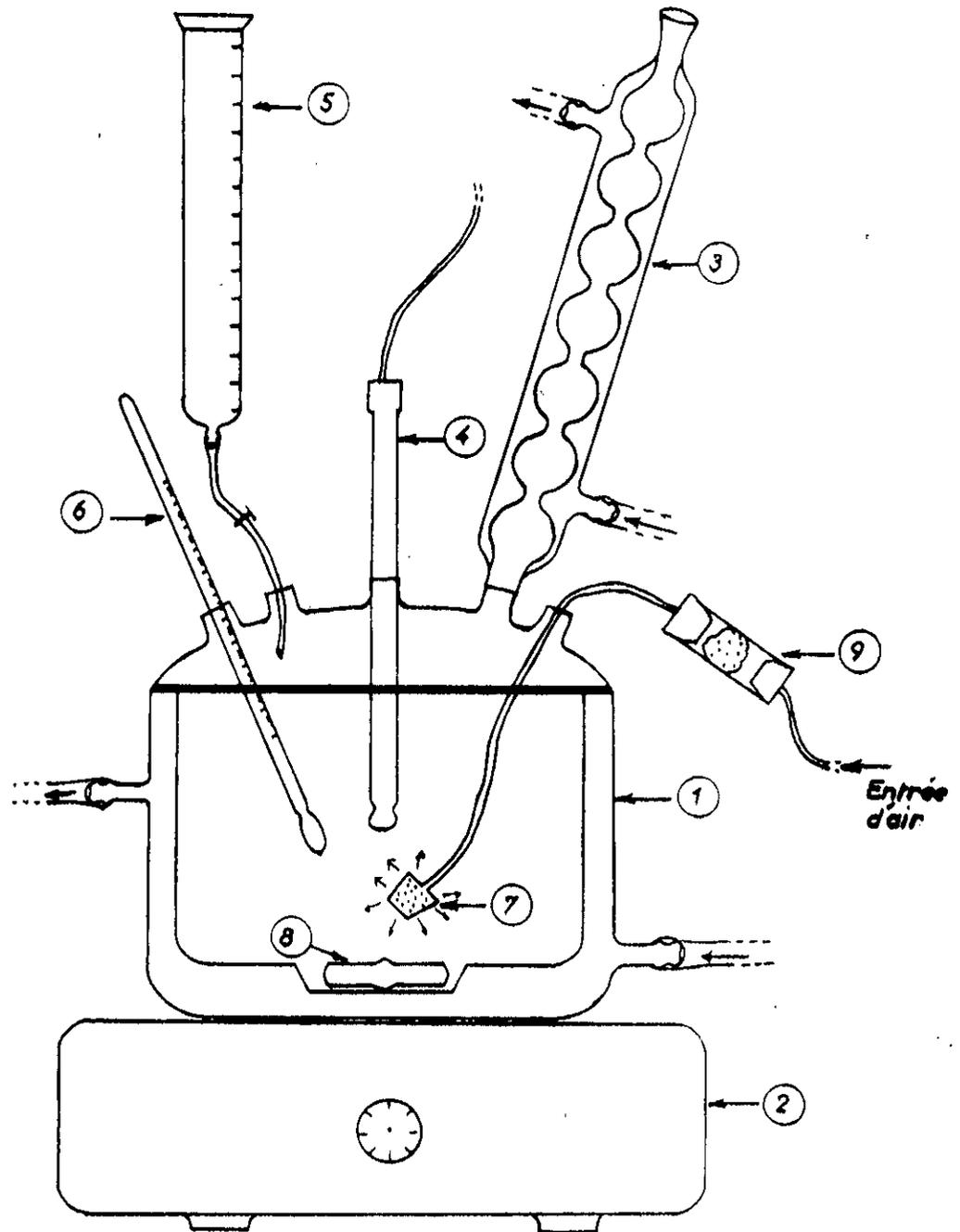


Figure 2 Montage expérimental (culture en fermenteur)

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| 1 - Fermenteur | 2 - agitateur magnétique |
| 3 - Réfrigérant | 4 - électrode de pH |
| 5 - burette de soude | 6 - thermomètre |
| 7 - Diffuseur d'air | 8 - Barreau magnétique |
| 9 - Filtre à air | |

2. Mesure de la croissance :

La croissance est mesurée par une méthode optique (mesure de la densité optique, DO)

2.1 Prélèvement et mesure de la DO

On prélève stérilement un petit volume de milieu de culture (0,2 à 0,3 ml) et on le dilue avec de l'eau distillée. Le rapport de dilution va de 1/5 au début de la fermentation à 1/50 ou 1/80 en fin de réaction.

On mesure l'absorption lumineuse de chaque échantillon à 500 nm dans un spectrophotomètre.

Les prélèvements sont effectués toutes les heures jusqu'à la fin de la réaction fixée au moment où la DO atteint un palier.

2.2 Détermination de la matière sèche :

La matière sèche correspond à la biomasse. On la mesure à la fin de la fermentation.

Un volume de 10 ml d'une suspension de levures est centrifugé pendant 20 mn à 3500 tr/mn. Le culot est lavé à trois (03) reprises dans de l'eau distillée, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation.

Le culot ainsi lavé est remis en suspension dans 10 ml d'eau distillée et placé dans une capsule tarée, puis soumis à la dessiccation dans une étuve réglée à 105°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

Connaissant la matière sèche M.S à la fin de la fermentation ainsi que la densité optique correspondante DO_f , on pourra calculer la biomasse X pour chaque temps t , conformément à la relation suivante :

$$X = \frac{M.S \times DO(t)}{DO_f} \quad (21)$$

où :

X : biomasse en g/l
 $M.S$: matière sèche en g/l
 $DO(t)$: densité optique mesurée au temps t
 DO_f : densité optique finale

Nous avons représenté sur la figure 8, la relation entre la densité optique et la matière sèche pour chaque concentration So .

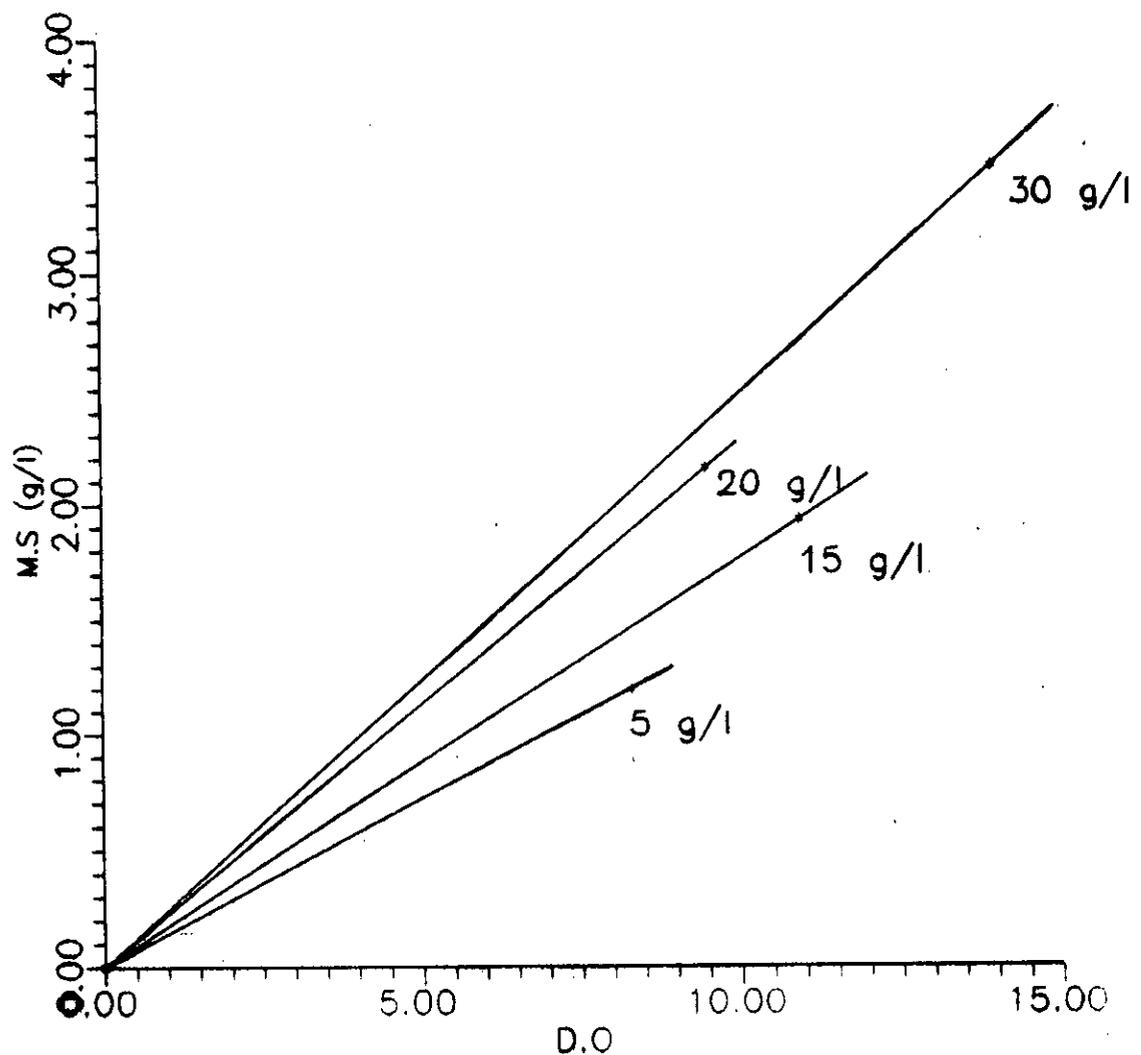
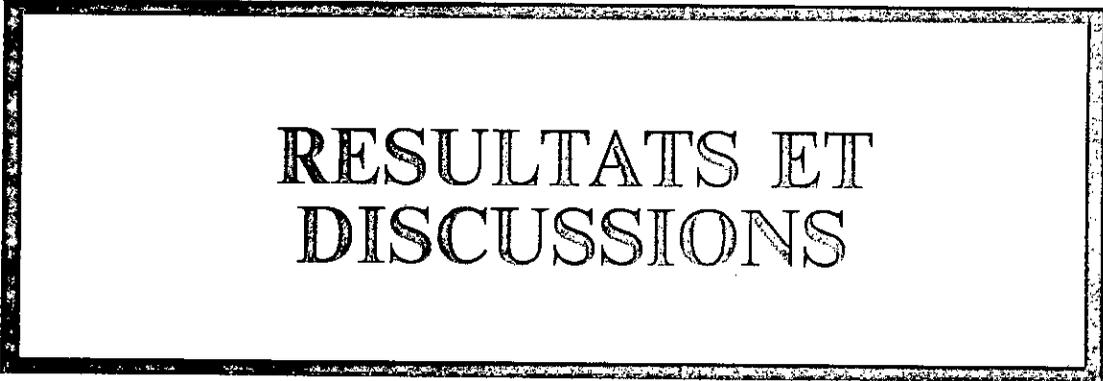


Figure 8: Courbes d'étalonnage de la biomasse pour *Kl. fragilis*.



RESULTATS ET
DISCUSSIONS

1. Les courbes de croissance :

Lors de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés à suivre l'évolution de la croissance de la levure *Kluyveromyces fragilis* à différentes concentrations initiales de substrat, tout en gardant les paramètres température et pH constants. En l'occurrence, nous avons choisi les valeurs de S_0 suivantes : 5, 15, 20 et 30 g/l. Après avoir pris les mesures de DO du milieu de culture à des intervalles d'une heure pendant la fermentation*, nous avons déduit les valeurs de la biomasse X correspondantes à partir de la relation (21) ou de la figure - 8. Puis nous avons tracé les courbes de croissance $X=f(t)$ pour chaque fermentation. (figures 9, 10, 11, 12 et 13 dans les pages qui suivent)

- **Allure des courbes** : La première chose que l'on peut dire de ces courbes, c'est qu'elles correspondent bien à ce que l'on attendait du point de vue allure générale. On peut différencier plus ou moins bien les différentes phases de la croissance, exceptée la phase de déclin car nous arrêtons toujours la fermentation en phase stationnaire.

- **La phase de latence** : Nous avons reporté sur le tableau 1 les durées des phases de latence pour chaque courbe. Sachant que ces phases sont les périodes d'adaptation des cellules au milieu, on peut tout de suite dire que les microorganismes mettent plus de temps pour s'adapter à un milieu plus concentré, probablement à cause de la pression osmotique qui y règne.

De plus on pourrait supposer que puisque l'on a pris un temps de préculture identique pour toutes les concentrations, soit 12 heures, ce temps a été insuffisant dans le cas de $S_0 = 30$ g/l, les levures n'ayant pas eu le temps de croître.

S_0 (g/l)	5	15	20	30
Temps de latence (h)	3	4	4	11

Tableau - 1

* Voir les courbes $DO=f(t)$ en annexe

Figure 9

Variation de la Biomasse en fonction du temps pour $S_0 = 5 \text{ g/l}$

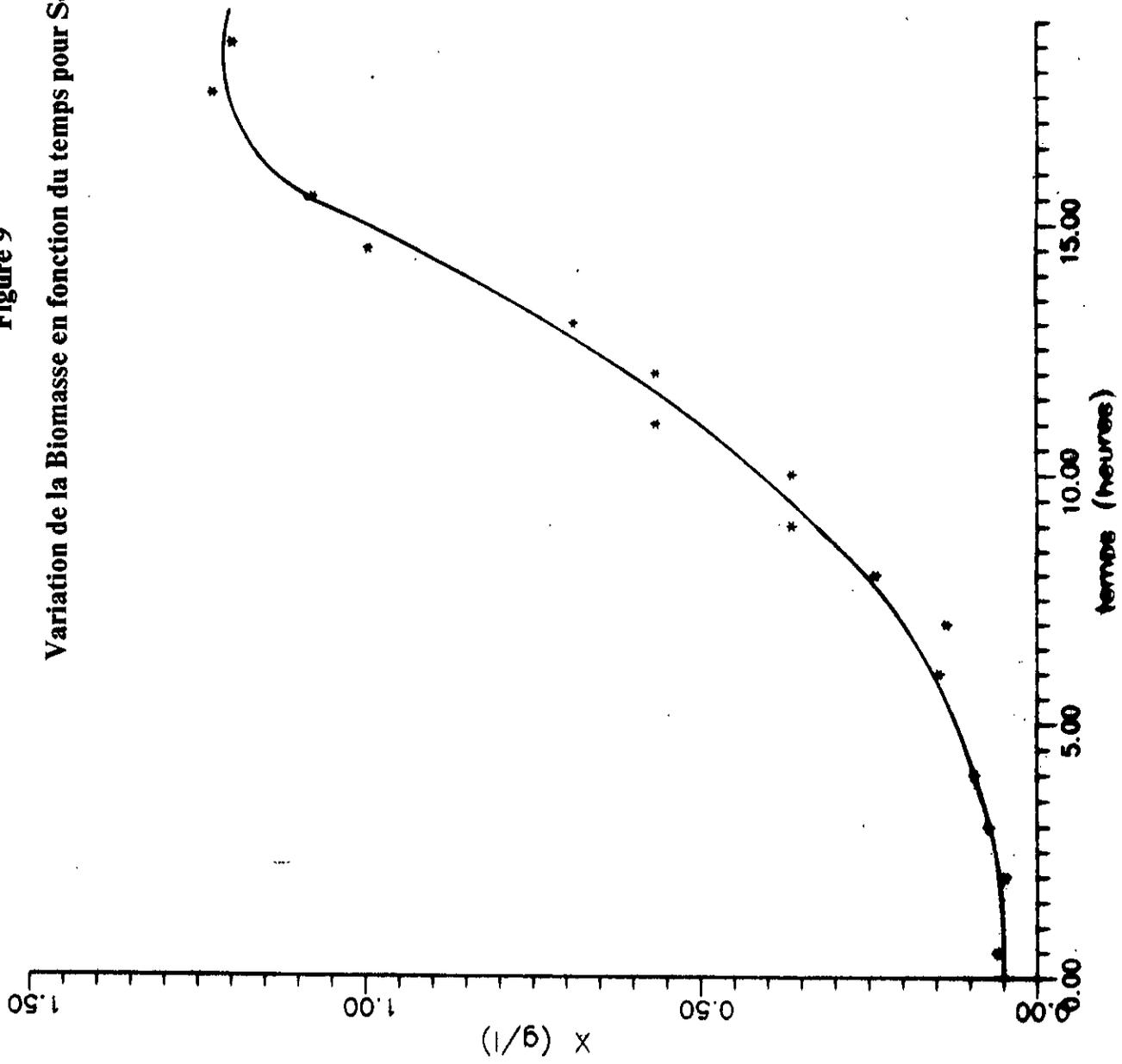


Figure 10

Variation de la Biomasse en fonction du temps pour $S_0 = 15 \text{ g/l}$

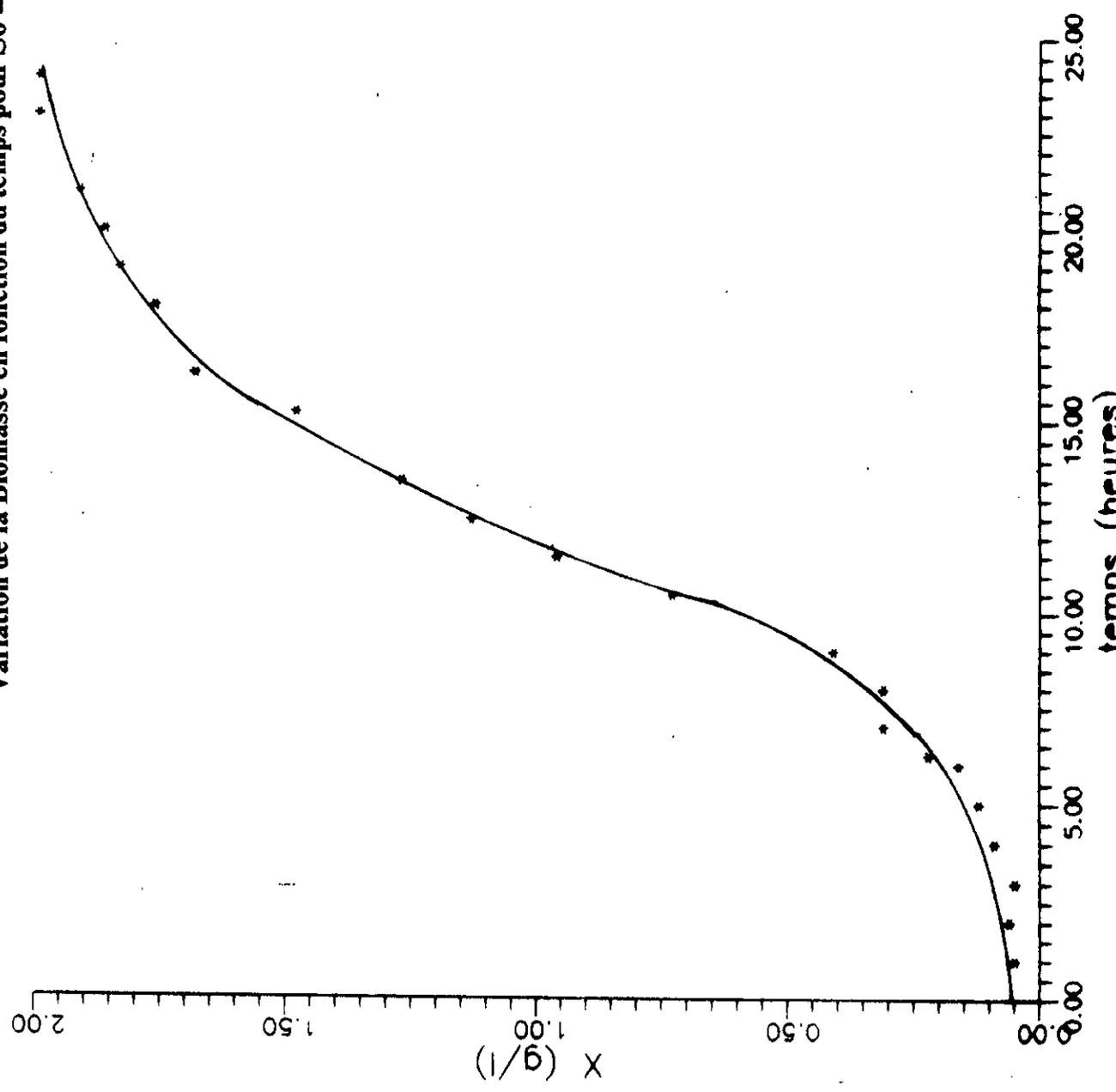
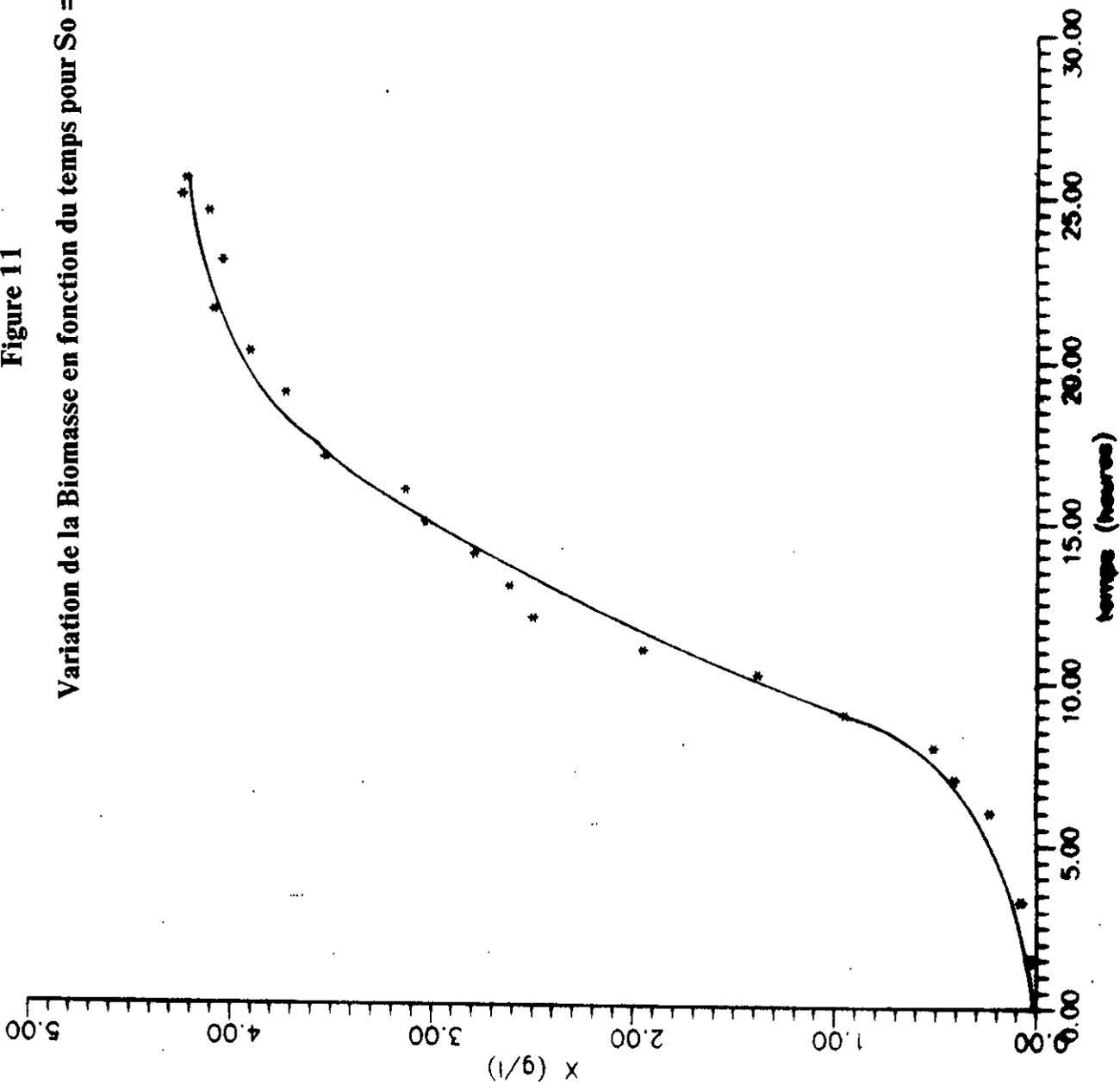


Figure 11

Variation de la Biomasse en fonction du temps pour $S_0 = 20 \text{ g/l}$



Variation de la Biomasse en fonction du temps pour $S_0 = 30 \text{ g/l}$

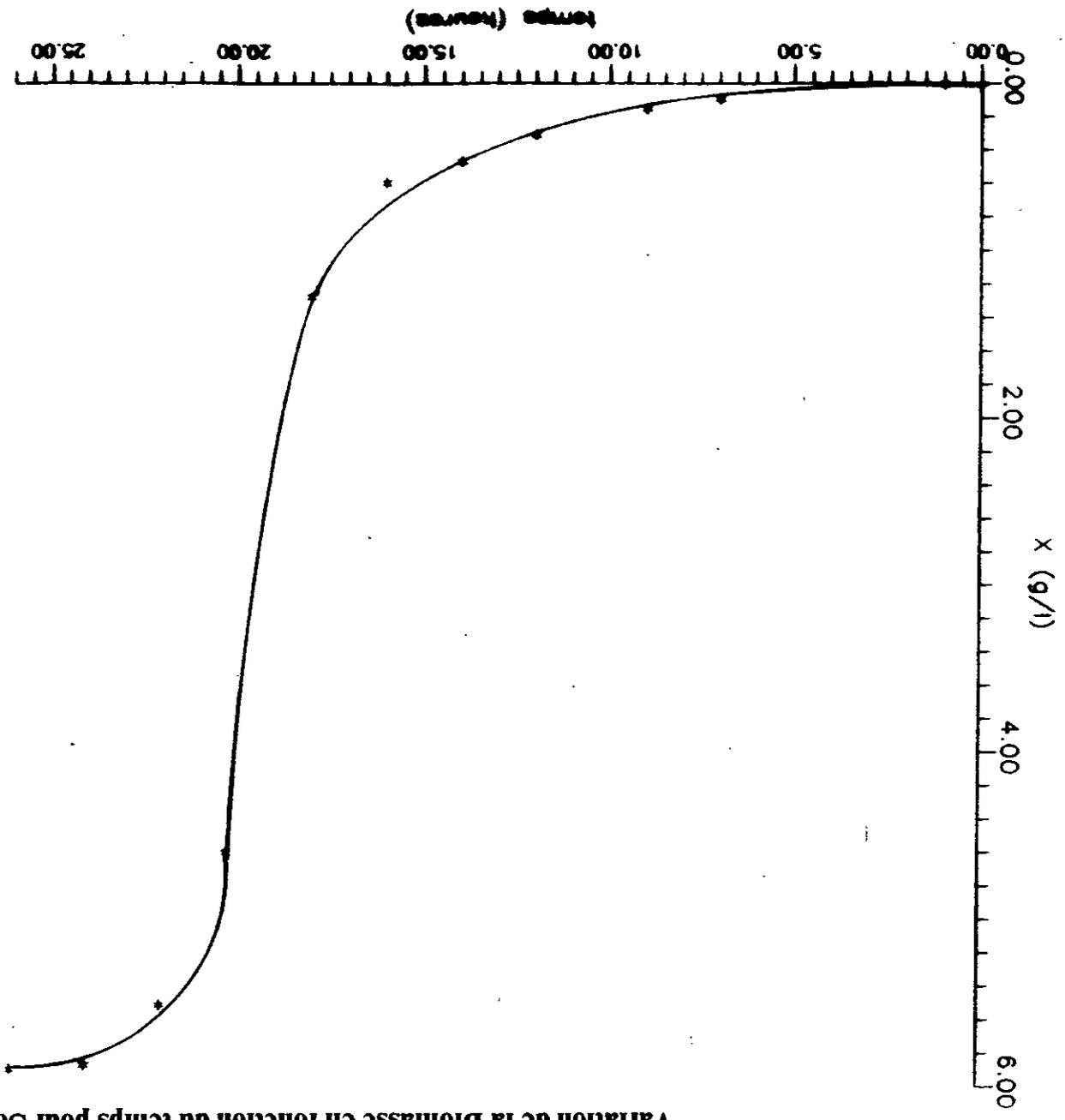
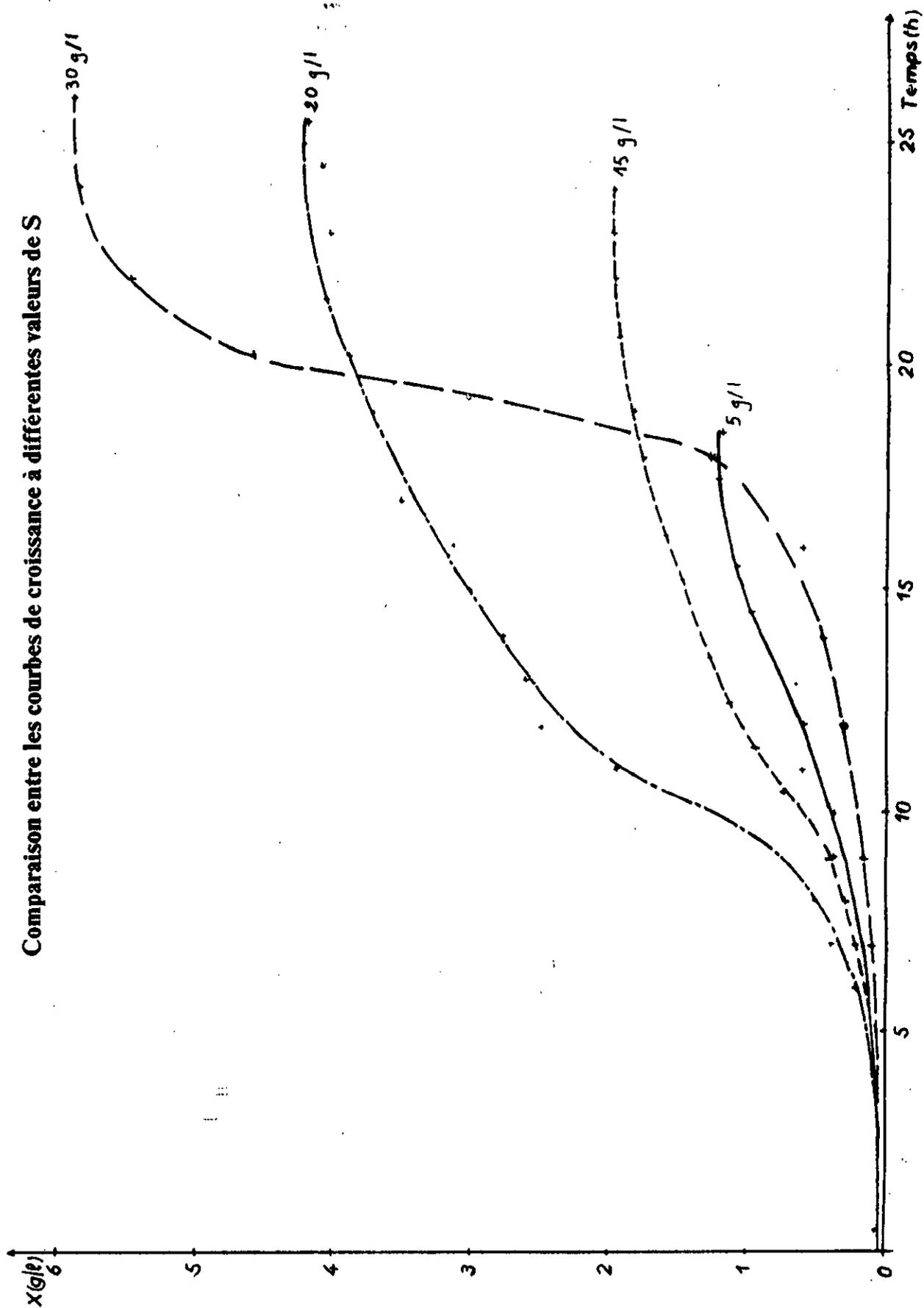


Figure 12

Figure 13

Comparison entre les courbes de croissance à différentes valeurs de S



- **La phase stationnaire** : Cette phase est atteinte lorsque les cellules ont épuisé leur substrat. La croissance s'arrête lorsque la biomasse a atteint sa valeur maximale X_f , les cellules conservent cependant un activité métabolique.

Durant cette phase, il y a des réactions de maintenance qui conduisent généralement à l'oxydation du substrat carboné. En dehors de toute croissance cellulaire, elles servent à maintenir en activité la biomasse.

En général on explique cette phase par : "Le nombre de cellules qui meurent est égal au nombre de cellules qui naissent".

Nous avons rapporté dans le tableau - 2, les valeurs de X_f ainsi que les temps auxquels elles sont obtenues :

S_0 (g/l)	5	15	20	30
X_f (g/l)	1,21	1,99	4,23	5,9
Temps (h)	17	22	25,5	24,5

Tableau - 2

Il est logique que pour les faibles concentrations la phase stationnaire est atteinte plus rapidement.

2. Le taux de croissance :

Le taux de croissance μ ou vitesse spécifique de croissance que l'on pourrait exprimer par (g de biomasse formée / g de biomasse présente . h).

Nous avons calculé la valeur de μ pour chaque intervalle d'une heure de la courbe de croissance et pour chaque valeur de S_0 . Pour cela, nous utilisons l'expression :

$$\mu = (X_2 - X_1) / (t_2 - t_1) X_{\text{moy}} \quad (22)$$

$$\text{avec } X_{\text{moy}} = \frac{X_2 + X_1}{2}$$

Nous avons tracé les variations de μ en fonction du temps pour chaque S_0 (figures 14, 15, 16 et 17).

Nous obtenons des tracés "en cloche". Chaque courbe débute avec $\mu = 0$, ce qui correspond à la phase de latence, puis croît jusqu'à un maximum, c'est la phase d'accélération. Le maximum correspond à la phase exponentielle durant laquelle $\mu = \text{Cte} = \mu_{\text{max}}$.

Figure 14

Variation de μ en fonction du temps pour $S_0 = 5 \text{ g/l}$

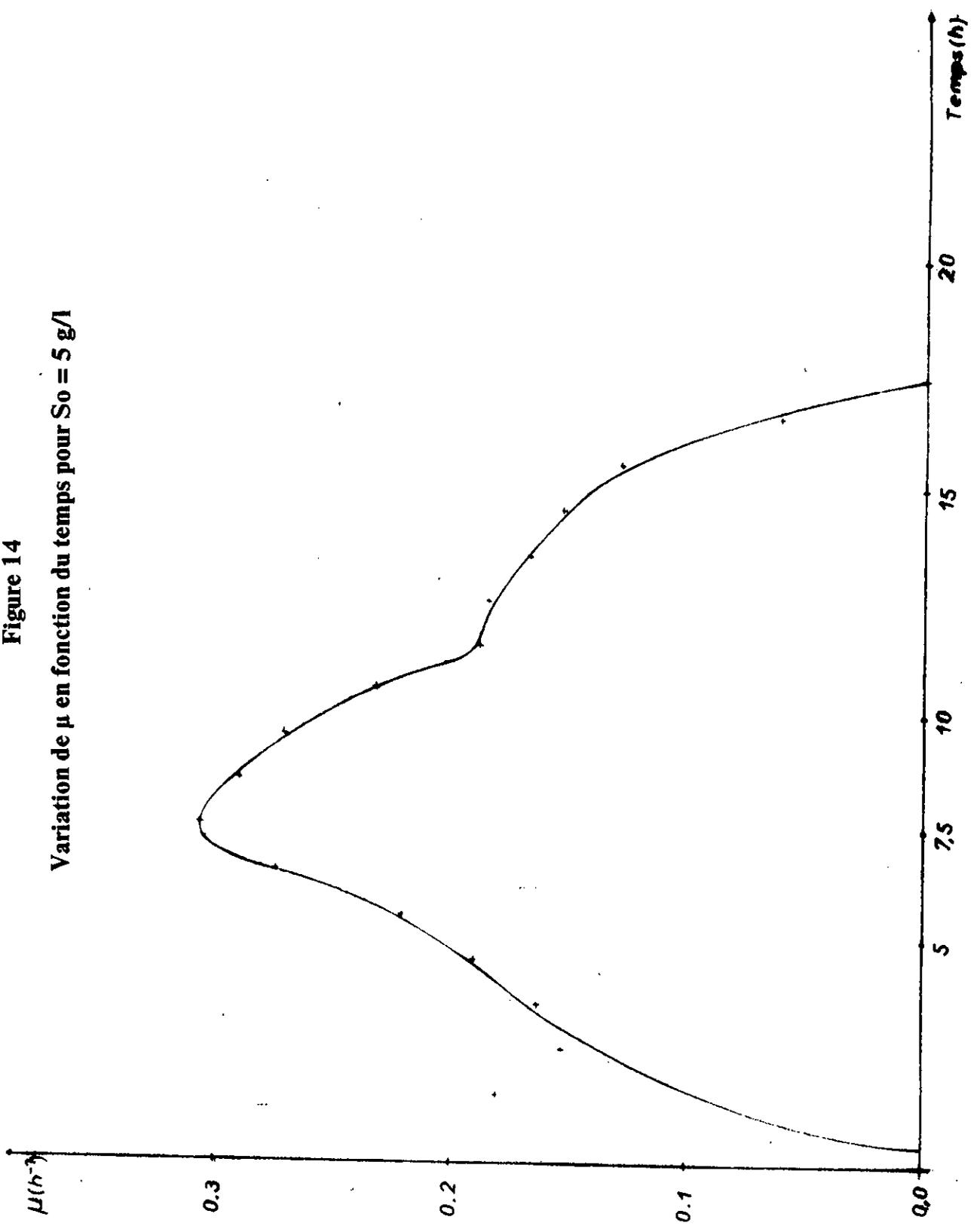


Figure 15

Variation de μ en fonction du temps pour $S_0 = 15 \text{ g/l}$

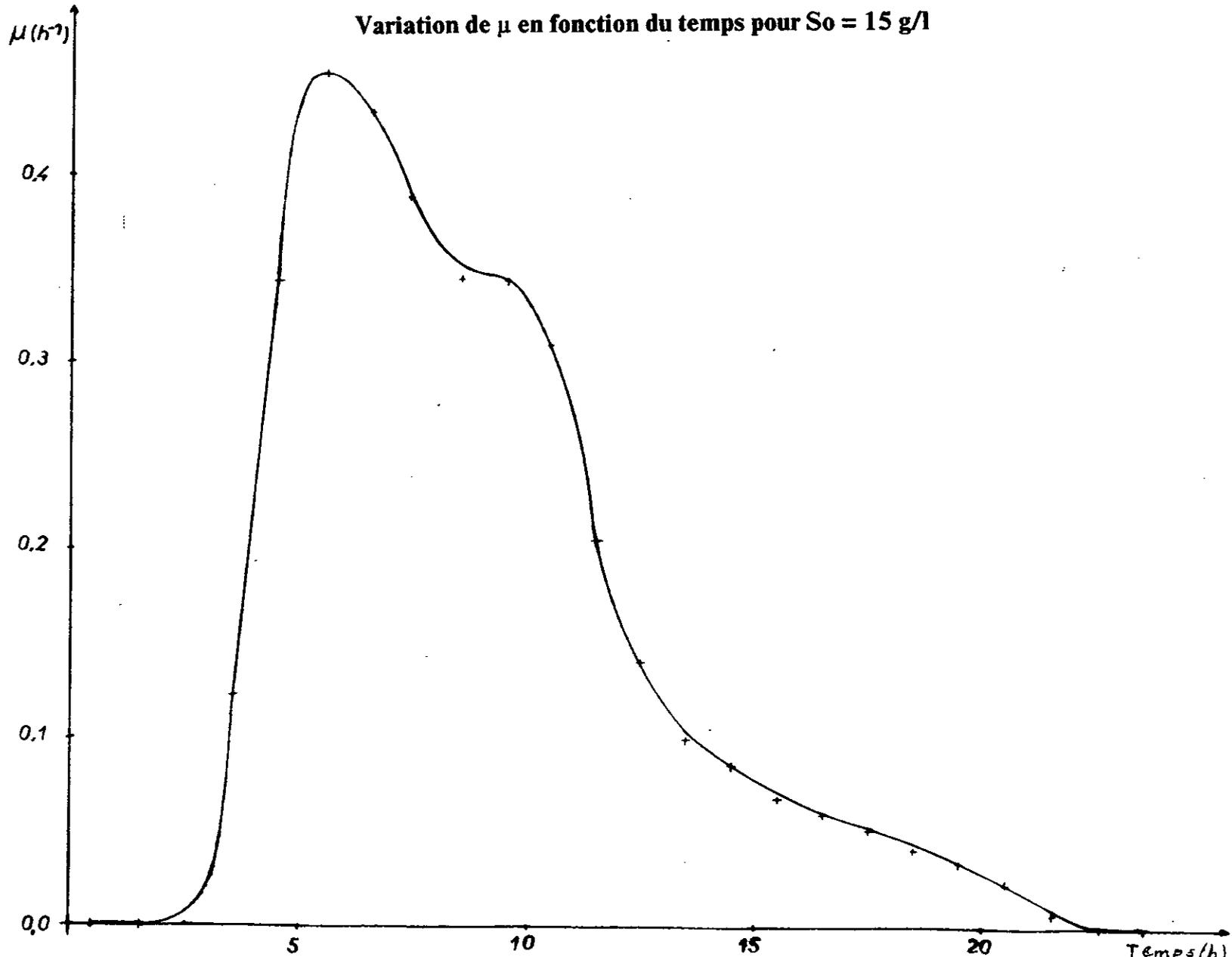


Figure 16

Variation de μ en fonction du temps pour $S_0 = 20 \text{ g/l}$

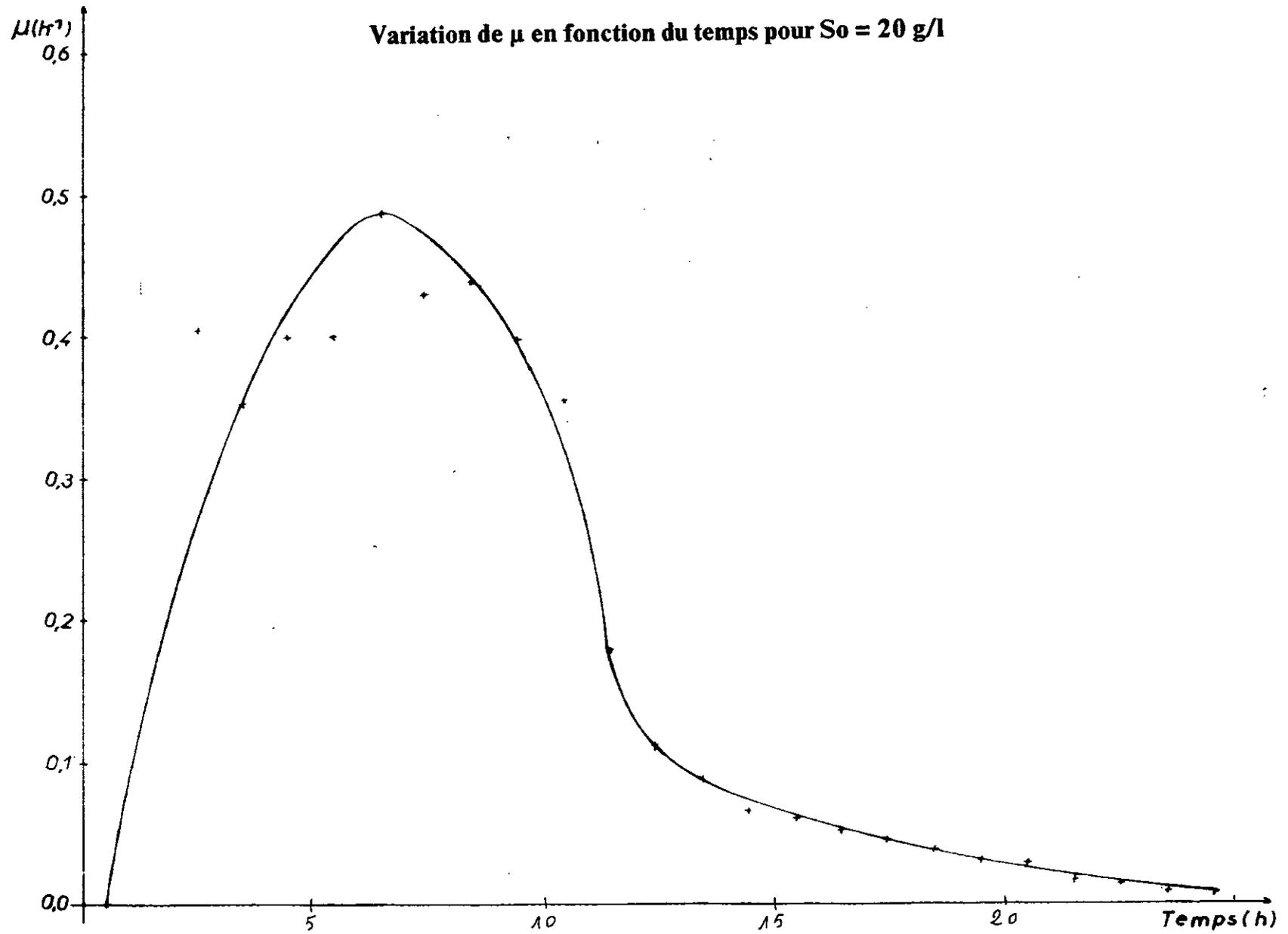
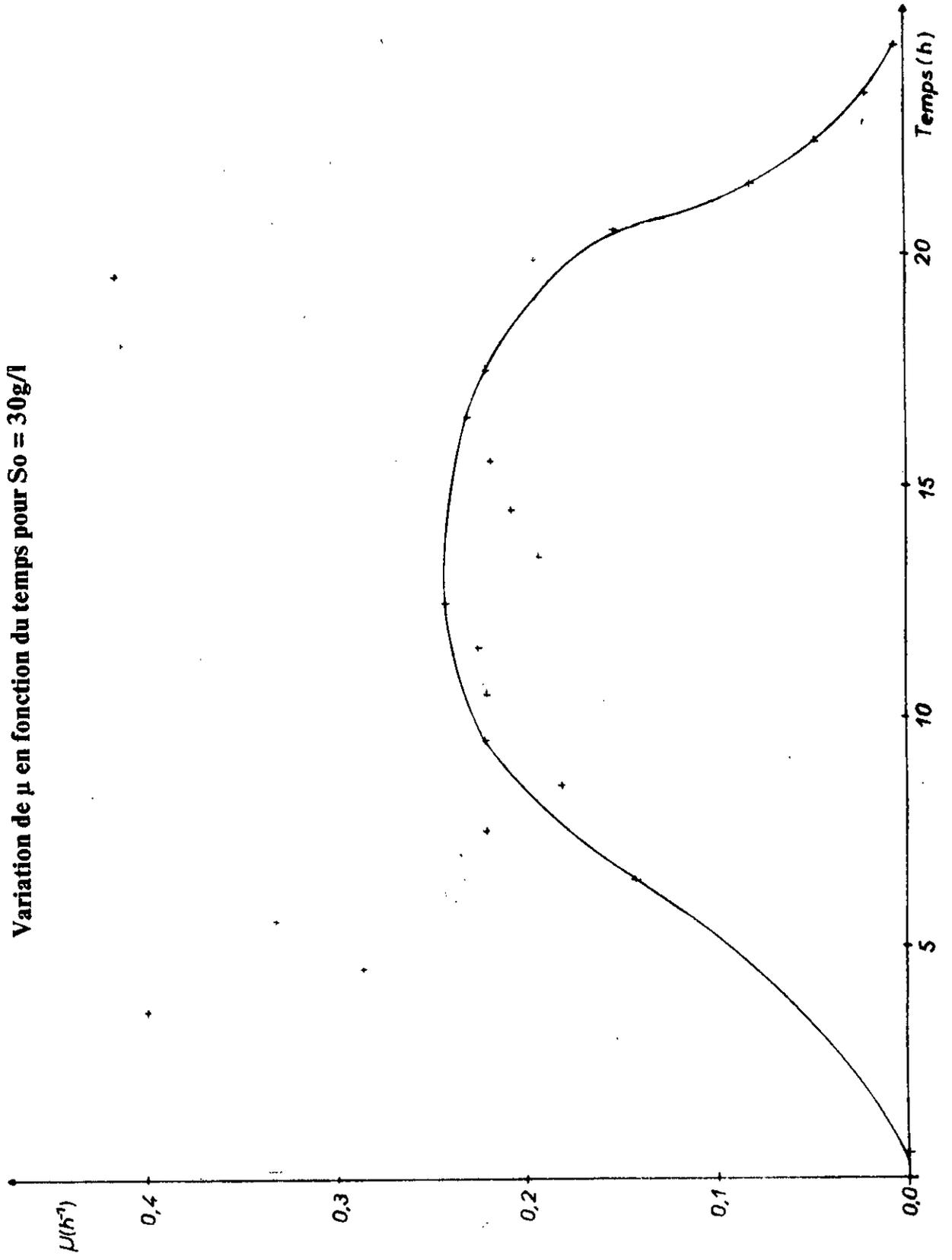


Figure 17

Variation de μ en fonction du temps pour $S_0 = 30\text{g/l}$



Sur nos courbes, on voit qu'en fait les phases exponentielles n'ont pas duré longtemps. on pourrait penser que la croissance a été limitée par l'oxygène ou par l'apparition dans le milieu d'un composé inhibiteur.

Les courbes se terminent enfin avec $\mu=0$, c'est la phase stationnaire.

Dans le cas de $S_o = 30$ g/l, on obtient une courbe $\mu = f(t)$ (figure 17) présentant beaucoup de fluctuations, on ne pourrait l'exploiter convenablement pour en tirer la valeur μ_{max} . D'après [31], les périodes de latence importantes peuvent modifier notablement l'évolution de la biomasse X. Cela explique peut-être l'allure de $\mu=f(t)$ pour $S_o=30$ g/l

Nous avons reporté sur le tableau - 3 les valeurs maximales du taux de croissance ainsi que les temps auxquels elles sont obtenues.

S_o (g/l)	5	15	20	30
μ_{max} (h^{-1})	0,308	0,455	0,49	-
Temps (h)	7h 30	5h 30	6h 30	-

Tableau - 3

3. Le temps de doublement t_D :

Le temps de doublement t_D ou temps de génération, désigne le temps nécessaire pour que la concentration microbienne X ait doublé. Il est exprimé par la relation :

$$t_D = \frac{1}{\mu_{max}} \ln 2 \quad (23)$$

Laquelle est déduite de la relation (8).

Le temps de doublement garde sa valeur minimale tout au long de la phase exponentielle. Cette valeur varie d'un microorganisme à un autre et pour un microorganisme, en fonction des conditions (milieu de culture, température, oxygène, etc ...).

Chez les levures, le temps de dédoublement minimal est compris entre 1h 30 et 2h. Le tableau - 4 nous donne les valeurs de t_D obtenues. On peut dire qu'elles sont *correctes* pour des levures.

S_o (g/l)	5	15	20	30
t_D (h)	2h 15	1h 31	1h 25	-

Tableau - 4

4. Détermination de K_s et de μ_{\max} :

Comme dans le cas des réactions enzymatiques, le substrat peut jouer le rôle d'agent limitant, lorsque sa concentration S devient trop faible.

Etant donné que le lactose n'est pas un inhibiteur de la croissance, on peut utiliser la loi de MONOD pour représenter quantitativement l'effet de S sur le taux de croissance μ , sous la forme :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad (12)$$

N'ayant que trois valeurs de μ en fonction de S nous avons préféré déterminer les paramètres cinétiques K_s et μ_{\max} en utilisant la linéarisation de LINEWEAVER - BURK qui donne une représentation en double inverse $1/\mu = f(1/S)$. (figure 18 en page 56)

En effet, à partir de (12), on a :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{\max}} + \frac{K_s}{\mu_{\max}} \cdot \frac{1}{S}$$

Nous obtenons les valeurs de K_s et de μ_{\max}

$K_s = 0,485 \text{ g/l}$
$\mu_{\max} = 0,606 \text{ h}^{-1}$

On peut toujours représenter $\mu=f(S)$ en utilisant ces résultats (figure - 19) on reconnaît bien le tracé de la figure - 5. Le taux de croissance augmente avec S jusqu'à atteindre une valeur fixe μ_{\max} . Cette valeur est atteinte à partir de la concentration en lactose critique $S' \approx 26 \text{ g/l}$, d'après figure 19 (page 57).

K_s représente la concentration en substrat pour laquelle : $\mu = \mu_{\max}/2$

Selon la valeur de S , on peut avoir deux cas limites :

- pour les faibles valeurs de S ($S \ll K_s$) :

$$\mu = \frac{dX}{X \cdot dt} \sim \frac{\mu_{\max}}{K_s} \cdot S$$

et donc :

$$\frac{dX}{dt} \sim \frac{\mu_{\max}}{K_s} \cdot S \cdot X$$

Figure 18

Représentation linéaire de LINEWEAVER-BURK

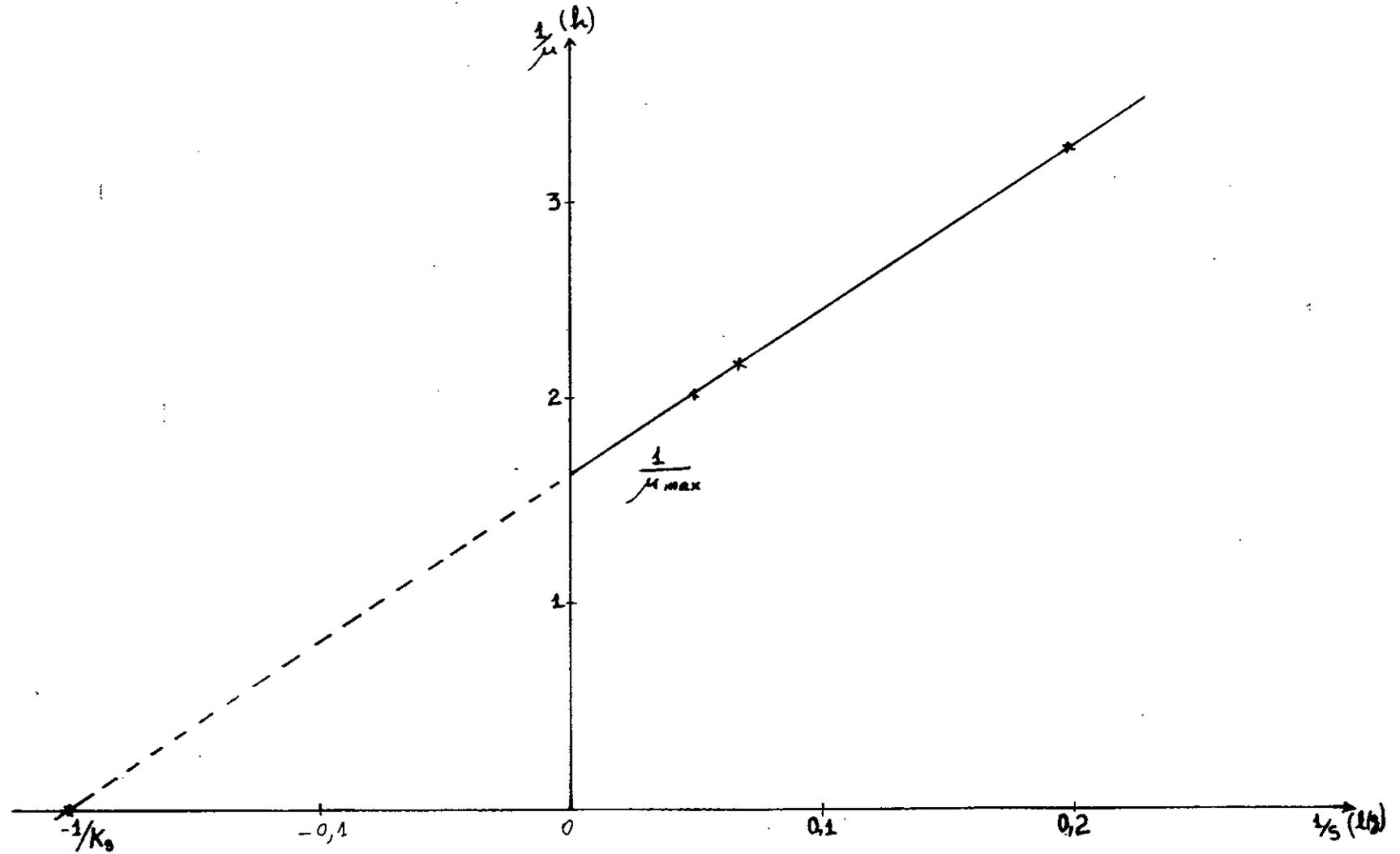
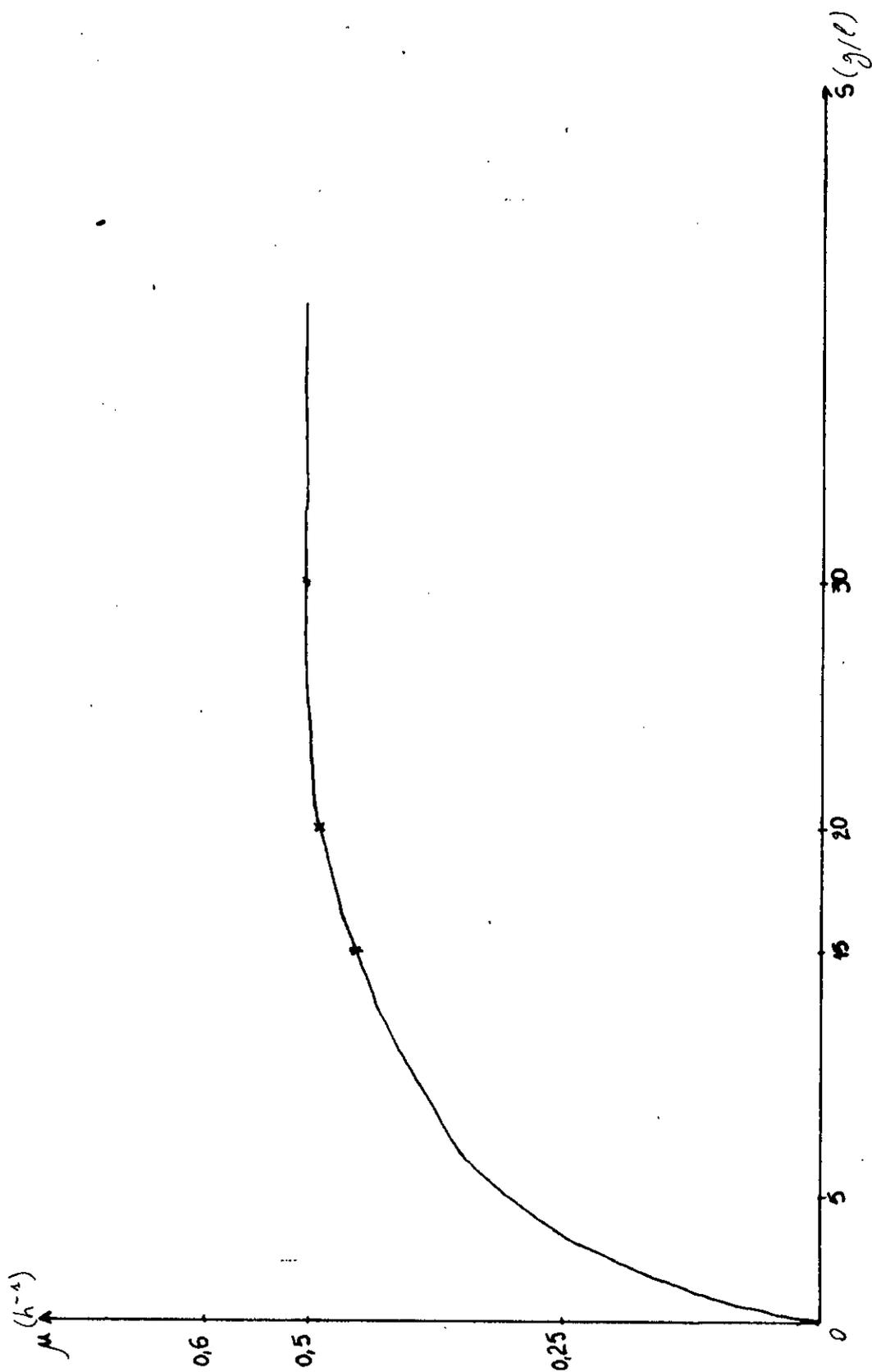


Figure 19 : Variation de μ en fonction de S



La croissance microbienne est donc cinétiquement d'ordre 1 par rapport au substrat et à la biomasse

- Pour les fortes valeurs de S (S >> K)

$$\mu = \frac{dX}{X \cdot dt} \sim \mu_{\max}$$

et

$$\frac{dX}{dt} \sim \mu_{\max} \cdot X$$

La croissance microbienne est d'ordre 1 par rapport à la biomasse et d'ordre 0 par rapport au substrat.

Pour des substrats glucides, Ks est de l'ordre de 1 à 100 mg/l. La valeur que nous avons obtenue est beaucoup plus grande. Cela peut être du à des contaminations par d'autres souches.

En général, les levures ont en moyenne un taux de croissance $\mu_{\max} = 0,46 \text{ h}^{-1}$ [31]. La valeur que nous obtenons $\mu_{\max} = 0,606 \text{ h}^{-1}$ reste valable pour les levures.

5. Le coefficient de conversion $Y_{X/S}$ ou rendement en biomasse

Les rendements en biomasse de chaque fermentation ont été calculés à partir de la relation :

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f} \quad (9)$$

Nous avons obtenu les valeurs suivantes :

S_o (g/l)	5	15	20	30
$Y_{X/S}$	0,236	0,129	0,211	0,197

Tableau - 5

A l'exception de $Y_{X/S} = 0,129$, les rendements en biomasse sont relativement constants pour toutes les concentrations. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le substrat (lactose) n'est pas un facteur limitant.

Le rendement en biomasse moyen est donc $Y_{X/S} = 0,215$.

Ce rendement est bien sûr très loin des 50 et 53% des Industries BEL, mais nous ne devons pas perdre de vue que la souche que nous avons utilisée est une souche encore en phase d'expérimentation et qu'elle n'a pas encore subi d'améliorations quant à ses performances industrielles.

Toutefois un rendement faible peut s'expliquer par :

- la qualité de l'ensemencement; soit il n'y a pas eu une bonne croissance et la concentration en biomasse de l'inoculum est faible, soit ce dernier a été prélevé en phase de déclin des cellules ;

- le pH 3 est assez **limite** et les fluctuations qui interviennent tout au long de la fermentation peuvent aussi perturber la croissance des levures.

- La transformation d'une partie du substrat en alcool en anaérobiose. Cependant, l'aération n'est peut-être pas à mettre en cause, car étant donné le petit volume du fermenteur et l'efficacité de la pompe à air, nous avons pu effectuer une bonne aération du milieu.

Quant à la valeur $Y_{X/S} = 0,129$ pour $S_0 = 15$ g/l, elle peut être due à une erreur de manipulation ou à une perte de matière lors de la détermination de la matière sèche.

Dans la bibliographie on retrouve des rendements allant jusqu'à 80% de matière sèche avec 48% de protéines (REESSEN et NIELSEN, 1975) [6]

6. Calcul de la productivité

La productivité, qui exprime la quantité de biomasse (ou de métabolite) synthétisée par unité de temps et par unité de volume du bioréacteur, est une mesure de la performance globale d'une opération [30].

Dans un procédé discontinu (ou "batch"), cette productivité est calculée sur la durée totale qui inclut la durée de fermentation t_M ainsi que les temps de vidange t_V , de nettoyage t_N , de remplissage t_R , de stérilisation t_S et le temps latence. La durée totale de toutes ces opérations est ce qu'on appelle le temps de batch : t_b .

Pour notre part on estime que le temps de préparation du bioréacteur entre deux fermentations est théoriquement d'environ 2 heures.

La productivité totale est définie par :

$$P_T = \frac{X_f - X_0}{t_b} \quad (24)$$

Nous avons reporté sur le tableau - 6, les productivités totales des fermentations :

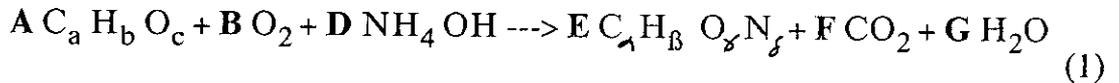
S_o (g/l)	5	15	20	30
t_b (h)	20h 30	26h	27h 30	28h
P_T (g/l.h)	0,0576	0,0744	0,1523	0,2095

Tableau - 6

La meilleure productivité est obtenue pour $S_o = 30$ g/l.

1. Les coefficients stoechiométriques :

Le bilan chimique de la réaction (1), permet d'aborder la formulation des milieux et de définir les conditions de culture.



Nous avons choisi la formule brute proposée par WANG pour représenter la biomasse de la levure.

Dans cette formule ; $C_6H_{11}O_3N$, de masse molaire 145 g, seuls 90% de la biomasse réellement produite sont représentés. Elle ne fait pas apparaître les cendres, qui représentent 10% de la matière sèche.

Connaissant les quantités de lactose mises en jeu et les masses de matières sèches obtenues, nous pourrions déterminer les coefficients stoechiométriques de la réaction (1). Nous avons reporté les valeurs trouvées pour chaque fermentation sur le tableau - 7

	A	B	D	E	F	G
$S_0=5 \text{ g/l}$	1	10,220	0,510	0,510	8,938	12,273
$S_0=15 \text{ g/l}$	1	10,170	0,280	0,280	10,310	10,150
$S_0=20 \text{ g/l}$	1	10,510	0,230	0,230	10,620	10,310
$S_0=30 \text{ g/l}$	1	10,390	0,247	0,247	10,520	10,260

Tableau - 7

Nous pouvons constater que les coefficients sont pratiquement constants d'une réaction à l'autre. Ceci signifie qu'il y a une bonne transformation du substrat en biomasse.

Dans la fermentation $S_0 = 5 \text{ g/l}$, la quantité de substrat transformé en biomasse est plus grande.

2. La demande en oxygène :

L'équation (2) de MATELES, obtenue en écrivant le bilan en oxygène de la réaction (1), permet d'évaluer la quantité d'oxygène devant être fournie.

$$O_x = 16 \left[\frac{2a+(b/2)-c}{Y_{X/S} \cdot M} + \frac{O'}{1600} - \frac{C'}{600} - \frac{H'}{200} + \frac{N'}{933} \right] \quad (2)$$

où : M est la masse molaire du lactose, soit M=342 g.

En calculant les pourcentages O', C', H' et N' de la biomasse, nous trouvons :

$$O'=33,103 ; C'=49,655 ; H'=7,586 ; N'=9,655$$

Les demandes en oxygène O_x exprimées en g d'oxygène/g de biomasse produite sont données dans le tableau - 8 :

S_o (g/l)	5	15	20	30
$Y_{X/S}$	0,236	0,129	0,211	0,197
O_x (g O_2 /g biomasse produite)	3,323	7,269	3,887	4,265

Tableau - 8

La demande en oxygène est inversement proportionnelle au coefficient de conversion $Y_{X/S}$ tel qu'on peut le voir sur la figure - 20, où (1) représente la variation de la demande en oxygène avec $1/Y_{X/S}$ pour une levure sur le lactose [30] et (2) est notre droite expérimentale.

L'écart entre (1) et (2) n'est pas très grand et elles ont pratiquement la même pente (voir figure 20 en page suivante).

La demande en oxygène des cultures est inégalement répartie dans le temps lors du déroulement de la fermentation.

Agissant comme un substrat, l'oxygène peut, dans certaines conditions, obéir à la loi de MONOD. Il en découle que l'on doit maintenir la concentration critique pour que la croissance microbienne se déroule dans les meilleures conditions. Sinon, l'oxygène joue le rôle de facteur limitant et la croissance est ralentie.

Pour les levures, la concentration critique en oxygène est 0,004 m moles/l.h à T = 30°C.

La difficulté d'assurer une bonne aération réside particulièrement dans la faible solubilité de l'oxygène dans les milieux de fermentation, surtout quand la température s'accroît. [30]

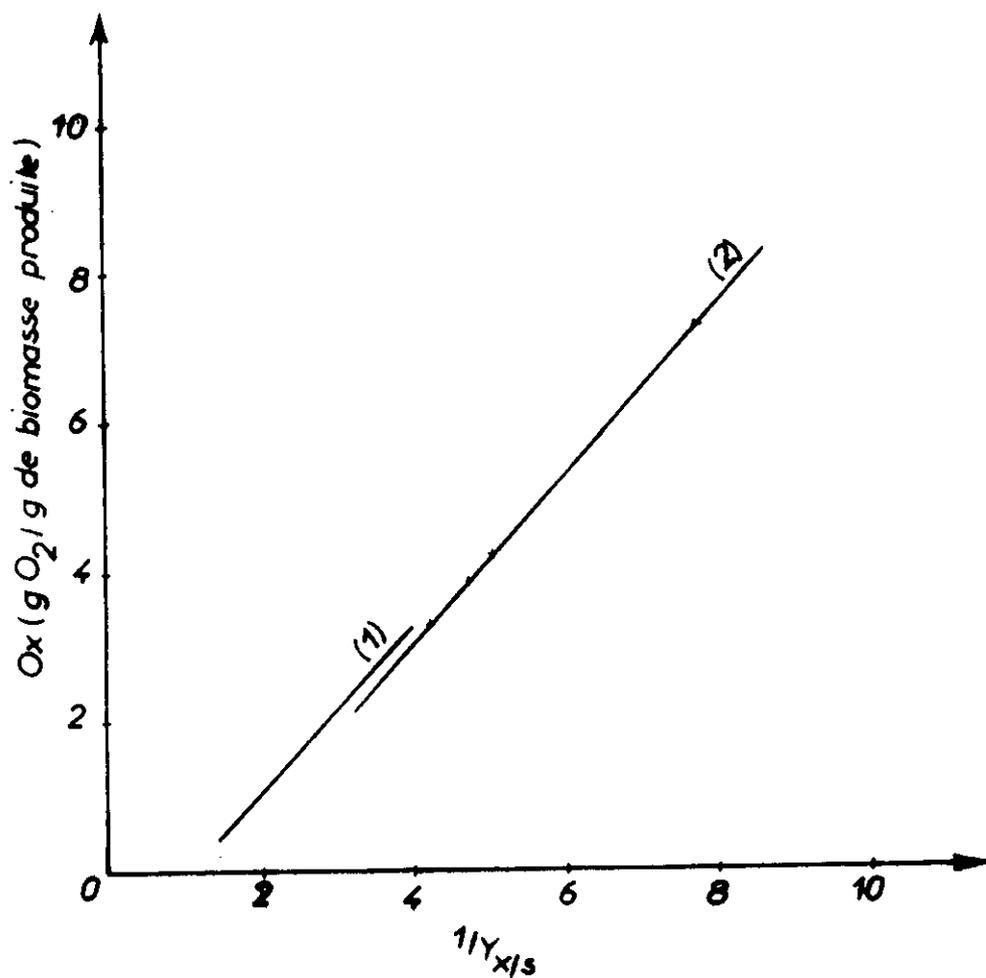


Figure 20: Variation de la demande en oxygène en fonction de $1/Y_{X/S}$

Comme il a été cité dans la partie bibliographique, le but de la modélisation est de décrire de façon concise un phénomène que l'on veut analyser, en utilisant des modèles mathématiques.

Nous allons donc essayer de traduire sous forme mathématique les courbes de croissance que nous avons obtenues. Pour cela nous avons choisi le modèle de la loi polynomiale.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X [1 - (X/X_f)^a] \quad (20)$$

En prenant $a=2$.

Cette loi est une équation différentielle non linéaire et son obtention sous forme explicite présente quelques difficultés. L'estimation des paramètres μ et X_f doit donc se faire en utilisant des méthodes de régression non linéaire permettant, par itérations successives d'approcher les valeurs cherchées. Les méthodes de régression couramment utilisées sont celle du gradient, celle de GAUSS-NEWTON (1968) ou celle de MARQUARDT (1963). Cette dernière est la plus efficace car elle conduit plus rapidement au résultat.

Pour notre part, étant pris par le temps, nous avons emprunté un chemin différent. Nous avons mis l'équation (20) sous la forme de la fonction $dX/dt = f(X)$. Celle-ci se présente sous la forme d'un polynôme de degré 3. Puis nous avons exploité l'avantage que nous offre un logiciel (GRAPHER de Golden Software, Inc.) pour déterminer les coefficients d'un tel polynôme approchant notre courbe expérimentale $dX/dt = f(X)$. Pour chaque essai nous avons obtenu les valeurs des coefficients suivants :

So(g/l)	Degré	Coefficient	So(g/l)	Degré	Coefficient
5	0	0,00176155	20	0	-0,0529114
	1	0,180327		1	0,828184
	2	0,241663		2	-0,0391807
	3	-0,293846		3	0,0487955
15	0	-0,0261372	30	0	-0,124555
	1	0,662361		1	0,80689
	2	-0,570272		2	-0,0631737
	3	0,127105		3	-0,0121377

Les figures 21 à 25 représentant les approximations des variations $dX/dt = f(X)$ par ces polynômes nous permettent de visualiser l'écart entre les points expérimentaux et les courbes d'approximation.

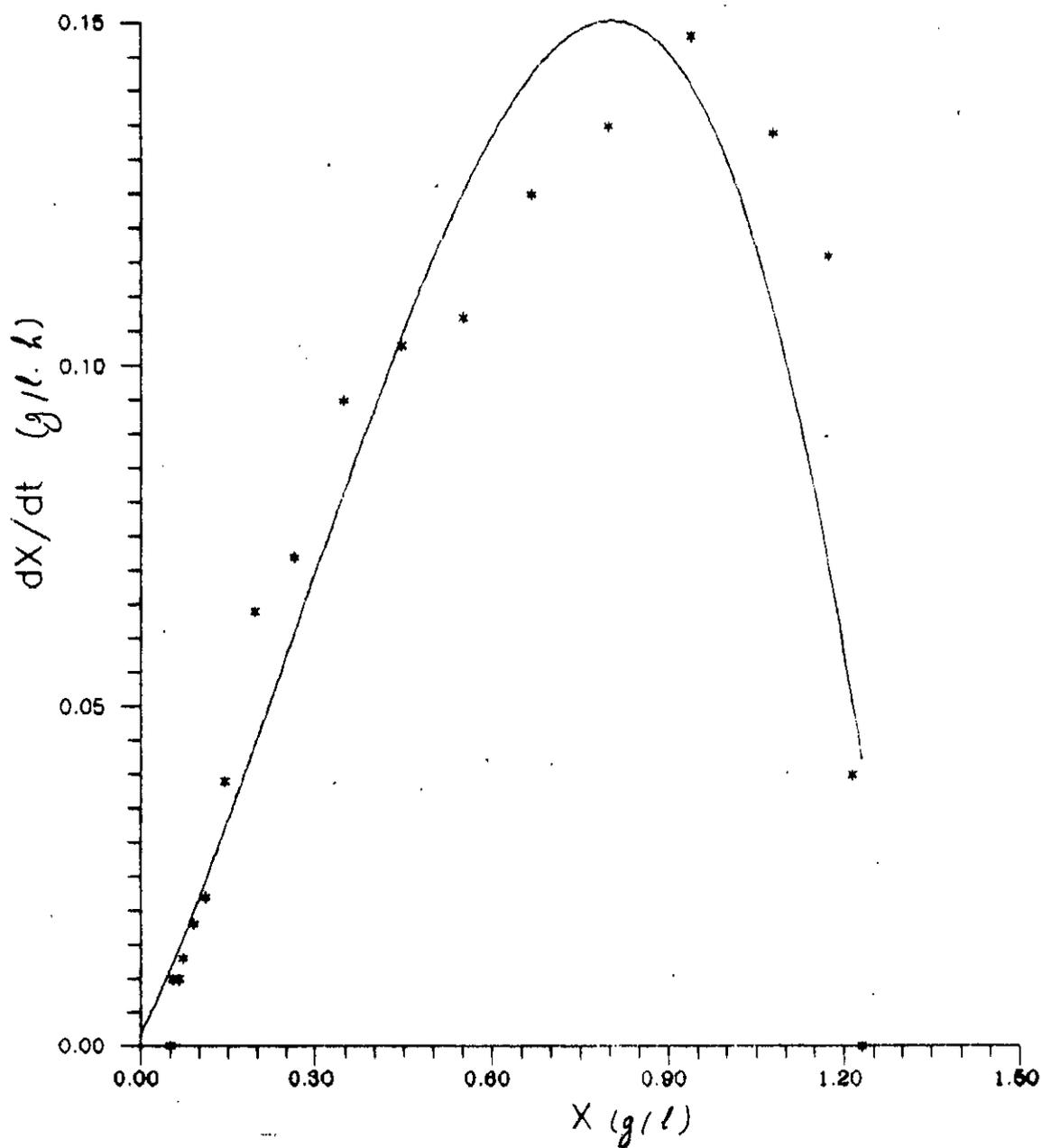


Figure 21 : Approximation de la variation de dX/dt en fonction de X par un polynôme de degré 3 pour $S_0=5$ g/l

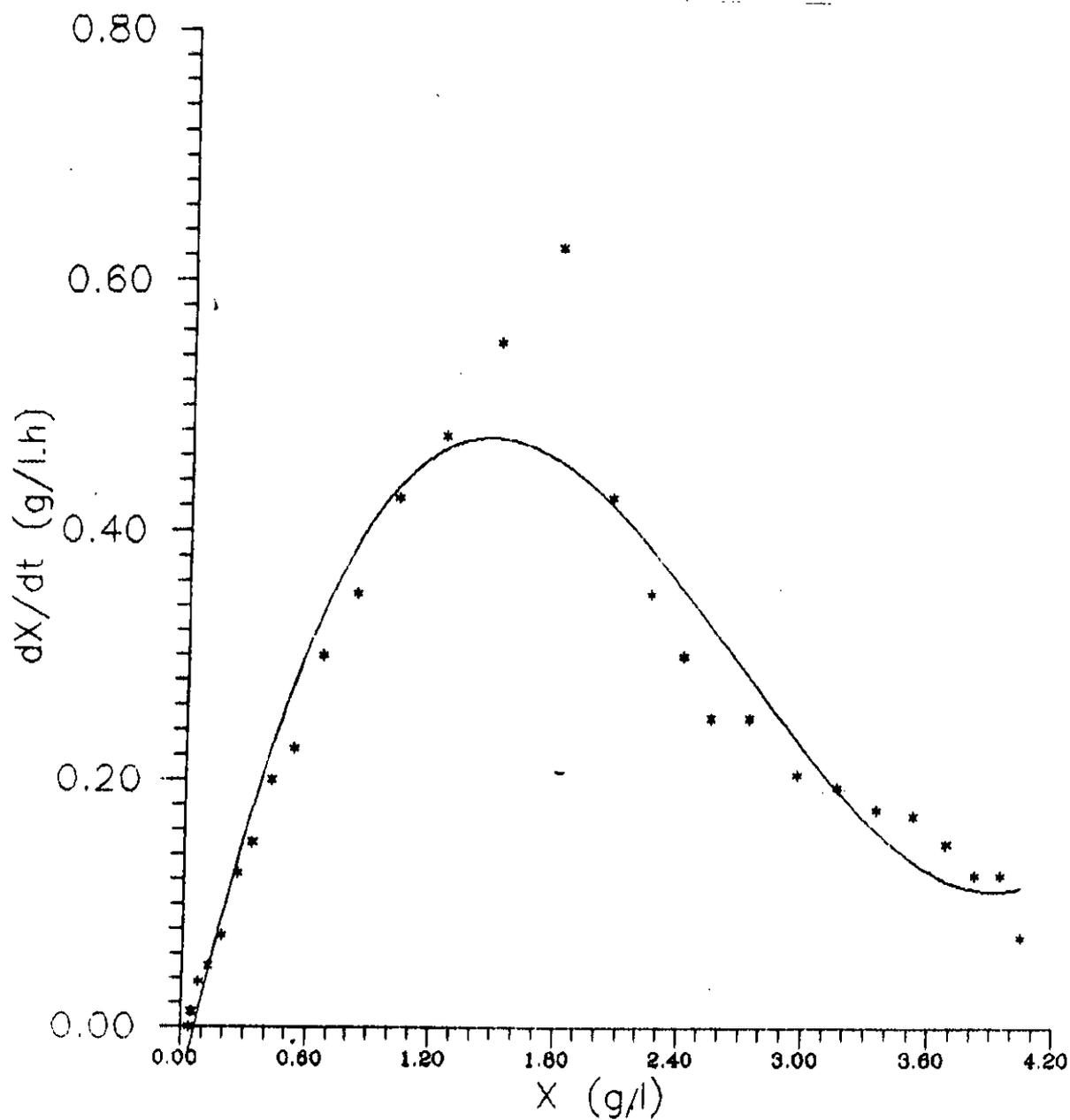


Figure 23 : Approximation de la variation de dX/dt en fonction de X par un polynôme de degré 3 pour $S_0=20$ g/l

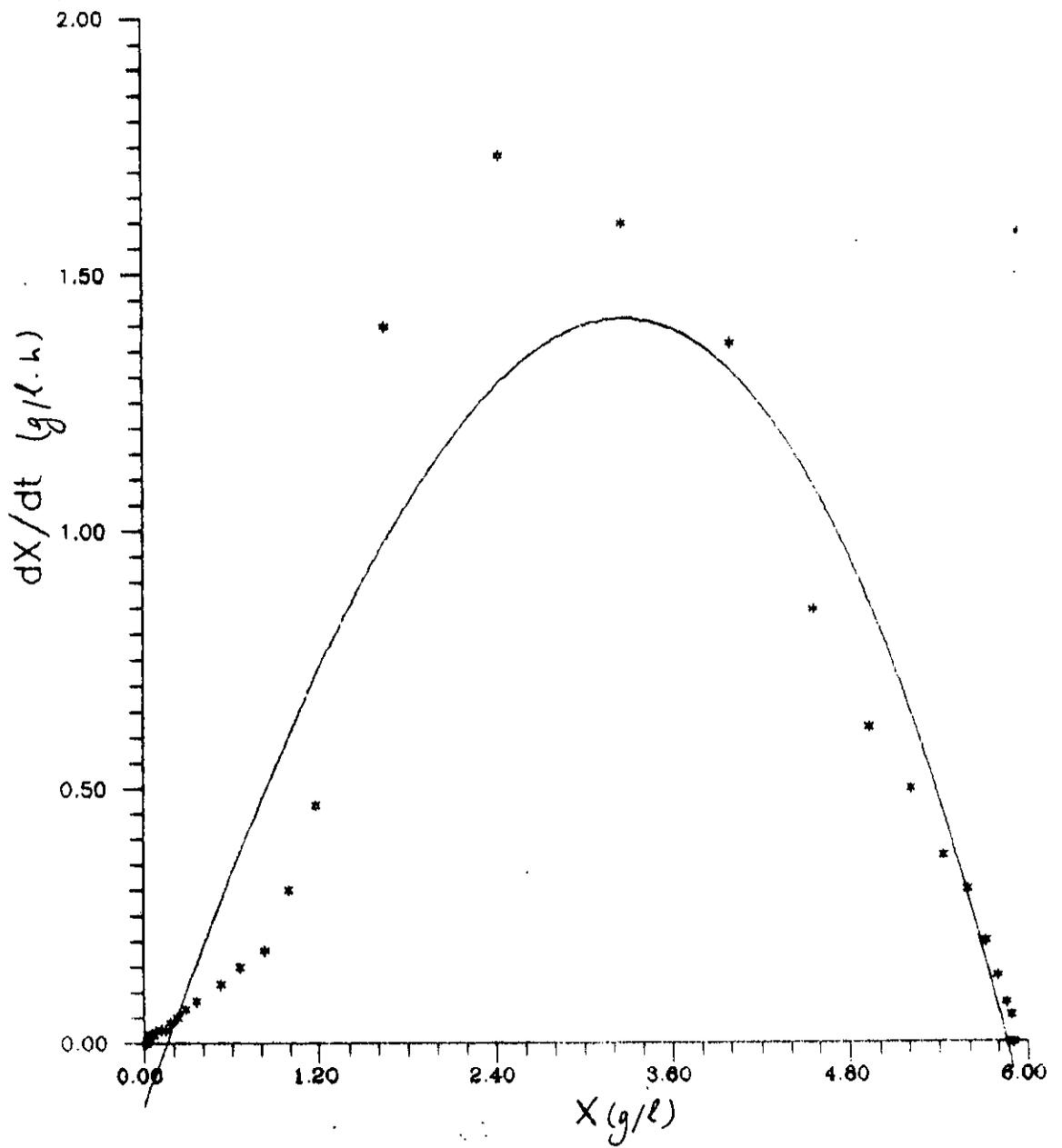


Figure 24 : Approximation de la variation de dX/dt en fonction de X par un polynôme de degré 3 pour $S_0=30$ (g/l)

CONCLUSION

Le but principal de notre travail a été comme l'indique le titre ; l'étude cinétique et la modélisation de la production de protéines d'organismes unicellulaires à partir de lactosérum. Nous aurions préféré faire un plus grand nombre de fermentations en étudiant par exemple l'influence des paramètres pH et température sur la cinétique de la croissance microbienne, mais le problème rencontré avec la souche ne nous l'a pas permis.

Nous avons donc essayé d'exploiter au maximum les quatre fermentations que nous avons pu réaliser.

Les résultats obtenus nous permettent de mieux cerner quelques unes des caractéristiques cinétiques de la souche utilisée (temps de latence, taux de croissance μ_{max} , constante d'affinité K_s).

La connaissance des courbes de croissance d'une souche sur un substrat donné est impérative lors de toute conception d'un bioréacteur à l'échelle industrielle. Il est nécessaire également de connaître suffisamment les phénomènes de transfert de matière et de chaleur, en particulier le problème de l'apport de l'oxygène au sein du milieu réactionnel dans le cas des procédés opérant en aérobiose.

Nous avons vu que les rendements en biomasse obtenus ne sont pas grands, il nous faudra donc envisager des moyens pour les améliorer. Nous pensons qu'il faut surtout se pencher sur la qualité de la souche utilisée et tenter de sélectionner des souches plus performantes pour une application industrielle économique.

La partie modélisation de notre travail n'a pas été conduite de la façon classique, elle reste donc incomplète. Il serait intéressant de concevoir des programmes simulant la croissance microbienne pour différents paramètres permettant un gain de temps et pouvant faire avancer les recherches dans ce domaine.

Enfin, nous pensons qu'il est nécessaire qu'il y ait une continuité dans les travaux effectués afin de concorder les efforts et d'arriver très vite à mettre en application des procédés industriels de production de P.O.U sur le lactosérum, car l'enjeu est très important tant du point de vue de l'environnement que celui de l'économie.

Il faudrait entre autres :

- Effectuer des fermentations sur lactosérum déprotéiné en améliorant sa composition ;
- Passer à des essais de production en continu à l'échelle laboratoire ;

- Faire des tests de qualité sur les P.O.U obtenues et tenter des introductions dans l'alimentation des animaux à l'échelle pilote.

REMARQUES GENERALES

Au fur et à mesure de l'expérimentation, nous avons fait quelques observations :

Le pH choisi (pH 3) n'est peut-être pas un pH optimum pour la croissance de *Kluyveromyces fragilis*. En effet, WASSERMAN situe son pH optimum aux environs de 5 à 5,7 [6]. Certes ce pH risque de favoriser la contamination par *Escherichia coli* mais un pH 3 ne nous met pas à l'abri des bactéries acidophiles. Il est donc préférable d'utiliser un autre mode de stérilisation que la stérilisation à froid qui n'est pas très sûre étant donné que les milieux de culture ne sont pas stérilisés. De plus le rinçage à l'eau chaude pour éliminer le chlore peut être insuffisant et on risque d'avoir une inhibition de la croissance, ou au contraire l'eau de rinçage peut recontaminer le matériel. Cette méthode est donc trop fastidieuse, la stérilisation à l'autoclave lui est nettement préférable; son utilisation est plus simple et surtout elle est plus sûre.

Le fait de ne pas pouvoir lire la densité optique pendant la préculture est un réel inconvénient. On ne peut pas choisir efficacement le moment le plus favorable pour ensemercer le milieu de culture. Une technique simple peut aider à résoudre ce problème à condition de disposer d'un spectrophotomètre adéquat. Elle consiste à utiliser des fioles erlenmeyers munies d'un tube latéral qui permet de lire facilement et aseptiquement la densité optique du milieu.

L'emploi d'un fermenteur de 120 ml pour la culture est avantageuse quant à l'aération. Cependant, il ne nous permet pas de faire des prélèvements importants pendant la durée de la fermentation afin de suivre, par exemple, l'évolution de la concentration en substrat, des matières sèches ou d'un éventuel produit de la fermentation. De plus pour des concentrations élevées en substrat, il y a formation de mousses.

Il serait intéressant de faire une observation au microscope du milieu de préculture avant d'ensemencer. On pourrait s'assurer ainsi de la pureté de l'inoculum et éviter de lancer une longue fermentation avec un milieu contaminé.

Comme les volumes prélevés pour la lecture de la densité optique sont très faibles, leur dilution à 1/50 ou 1/80 est délicate et la moindre erreur d'estimation donne de grands écarts de valeurs, et fausse l'allure de la courbe de croissance.

La durée de la fermentation jusqu'à la phase stationnaire est en moyenne de 24 heures. Ceci nécessite une présence permanente afin de

réguler le pH en ajoutant de la soude 0,2 N et d'effectuer les prélèvements toutes les heures pour mesurer la DO.

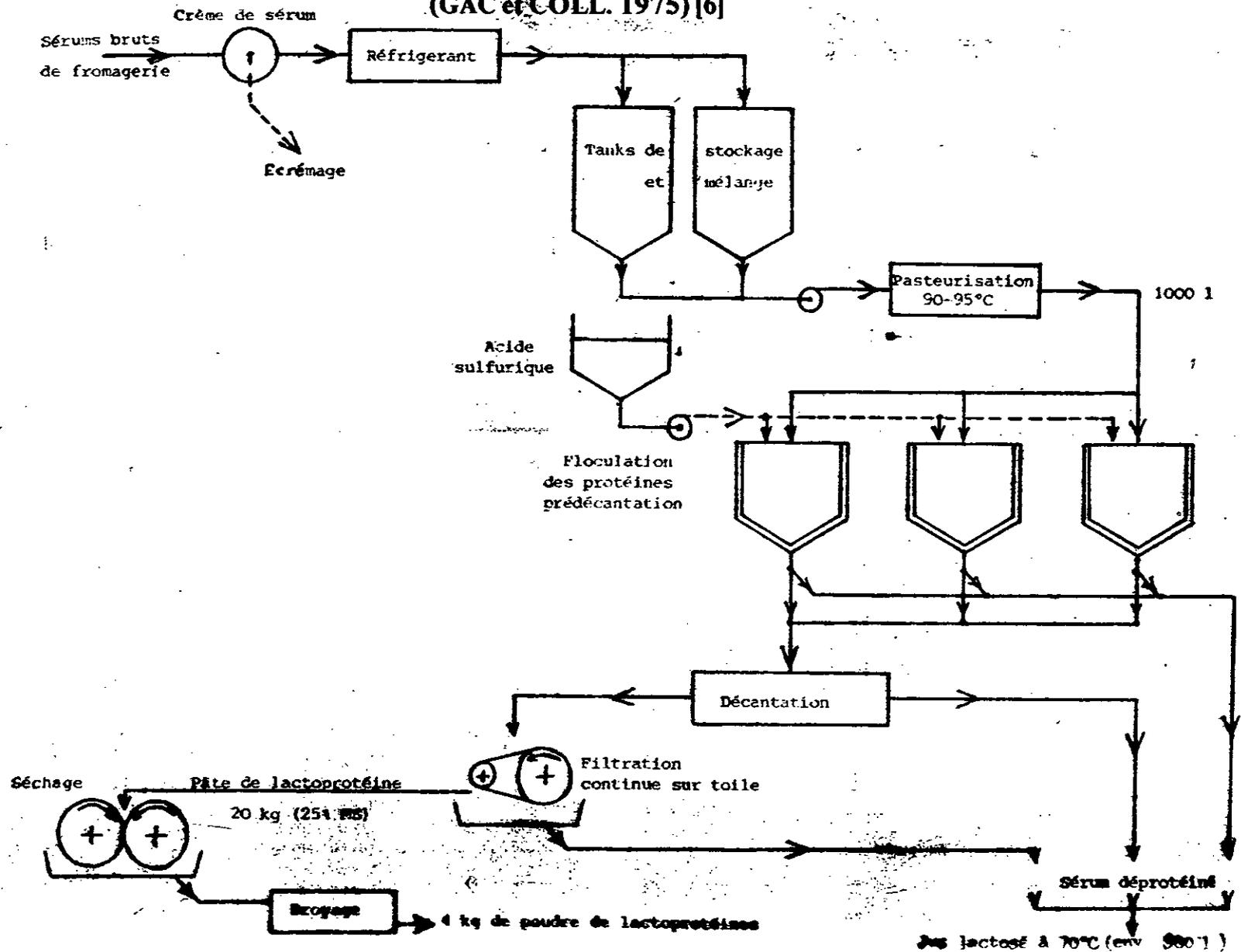
Enfin, nous devons ajouter qu'au bout de deux à trois semaines d'utilisation d'un même tube de levures, nous avons eu de plus en plus de difficultés à faire pousser la souche en conservant pourtant les mêmes conditions opératoires. Après renseignement auprès du laboratoire qui nous a fourni la souche, nous avons appris que tous les utilisateurs de la souche avaient eu le même problème : elle n'avait plus le même comportement après quelques temps d'utilisation. On a supposé que la souche initiale pouvait avoir subi des mutations et même que peut-être la souche isolée et considérée comme une *Kluyveromyces fragilis*, en réalité, n'en est pas une.

Pour notre part, certains résultats obtenus, nous permettent de penser que la souche initiale est une levure et qu'elle dégrade le lactose.

ANNEXES

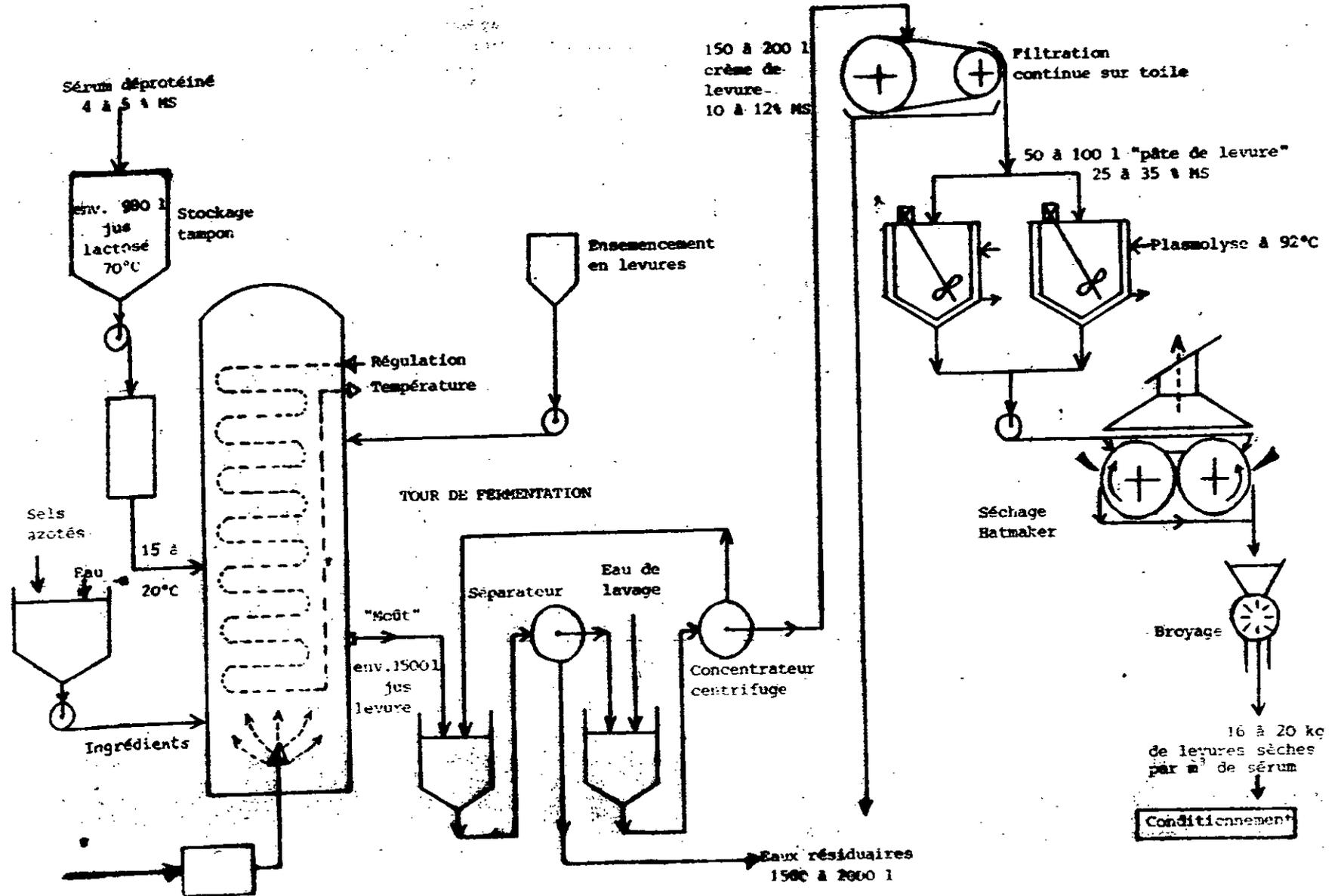
ANNEXE I

PROCEDE BEL INDUSTRIES (1ère partie) Extraction des lactoprotéines (diagramme simplifié) (GAC et COLL. 1975) [6]

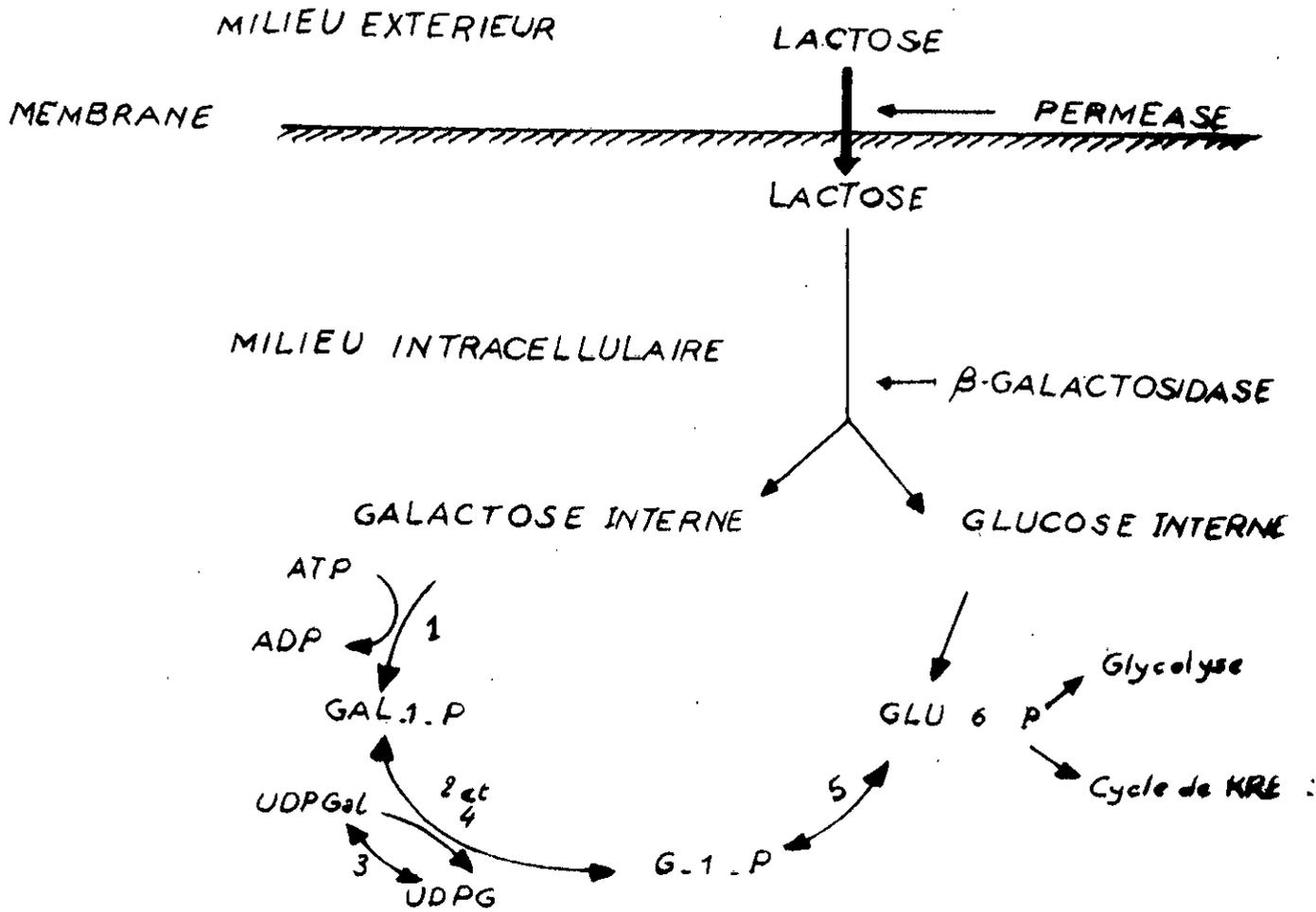


ANNEXE II

PROCEDE BEL INDUSTRIES (2ème partie) Fabrication de levure-aliments sur jus lactosés (GAC et COLL. 1975) [6]



ANNEXE III



Mécanisme du métabolisme du lactose chez la levure

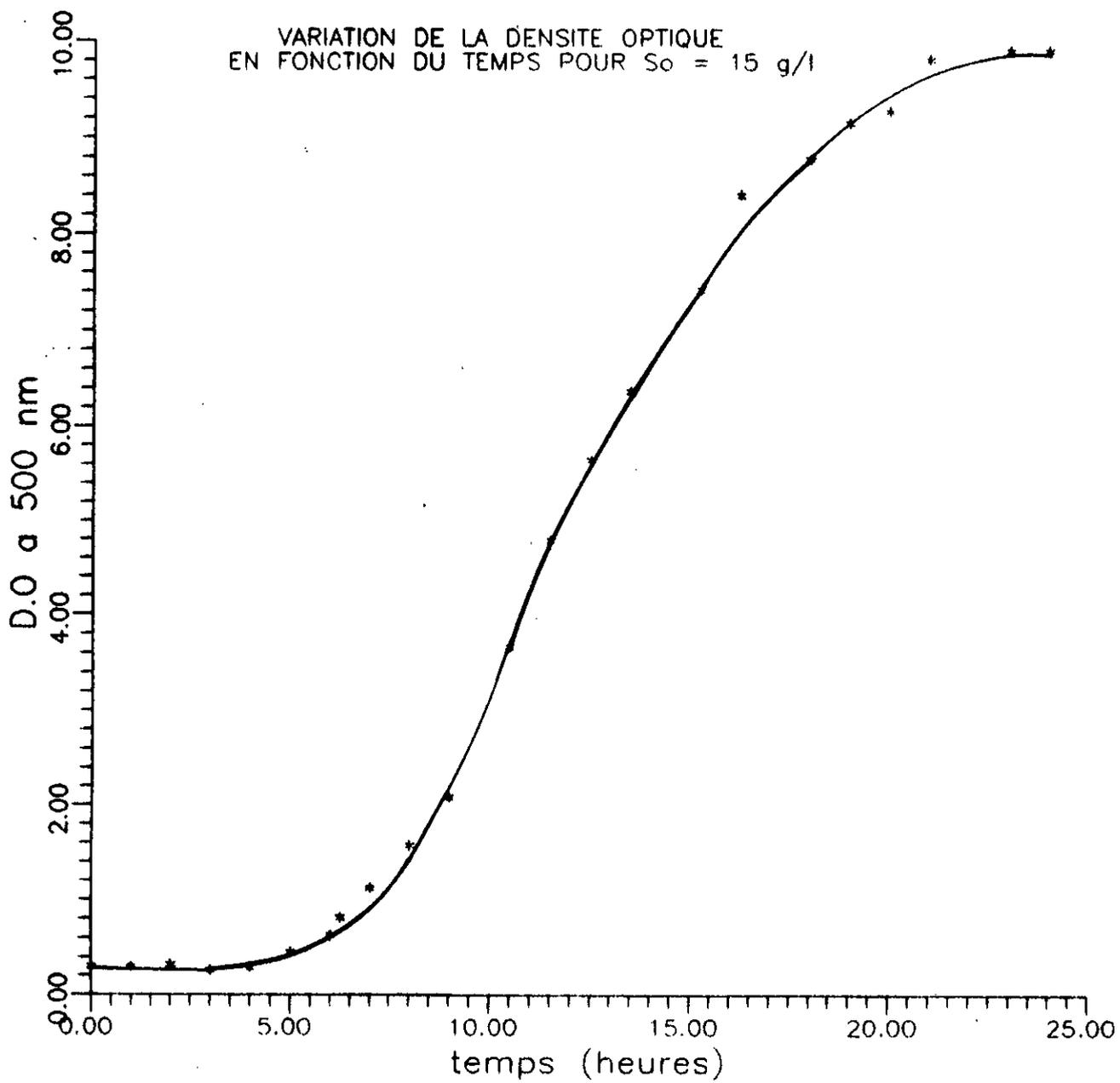
1 Galactokinase
2 Transférase
3 Epimérase

4 UDPG pyrophorylase
5 Phosphoglucomutase

(GALZY in APRIA, 1977)

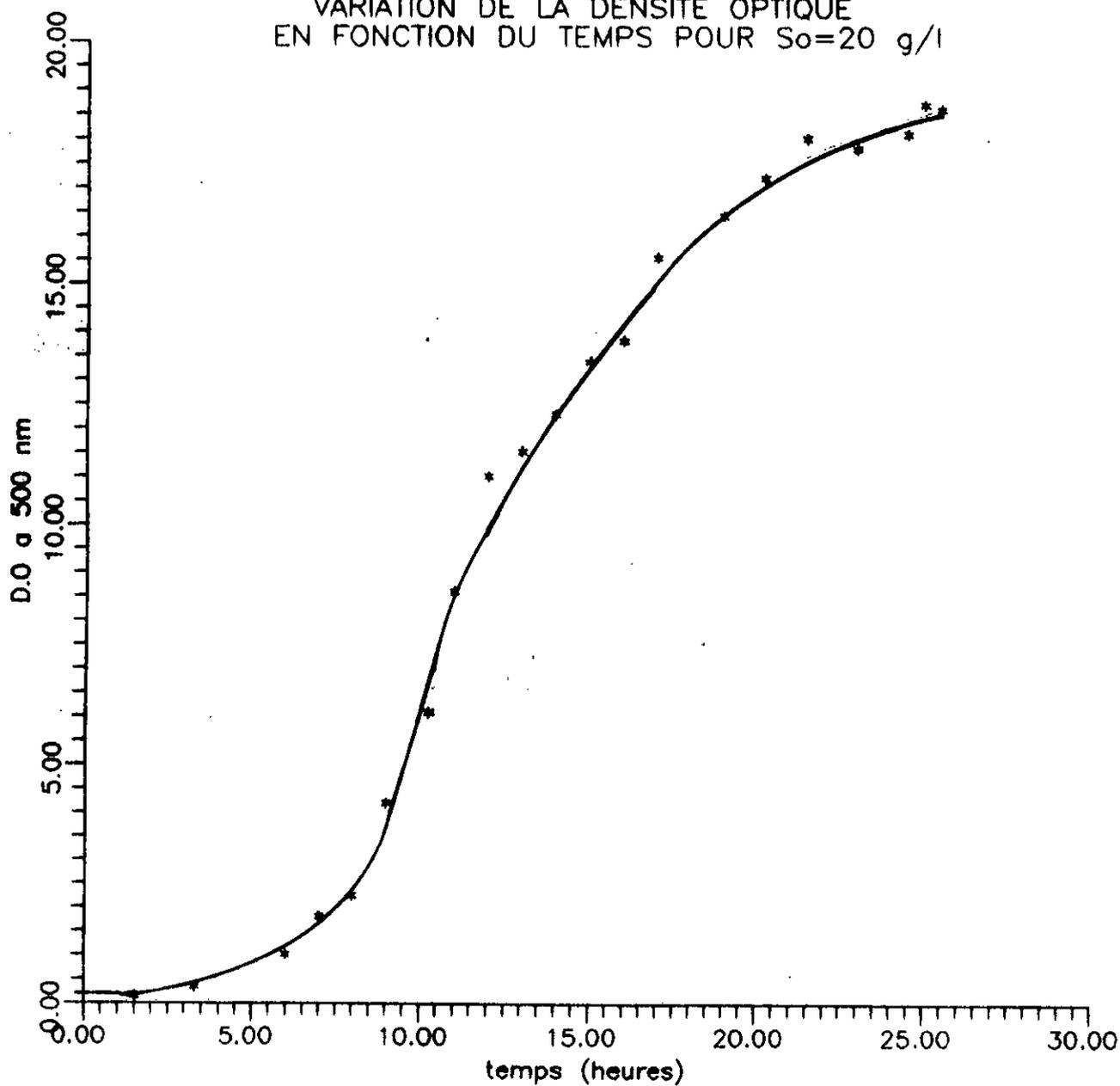
ANNEXE IV

VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE
EN FONCTION DU TEMPS POUR $S_0 = 15$ g/l



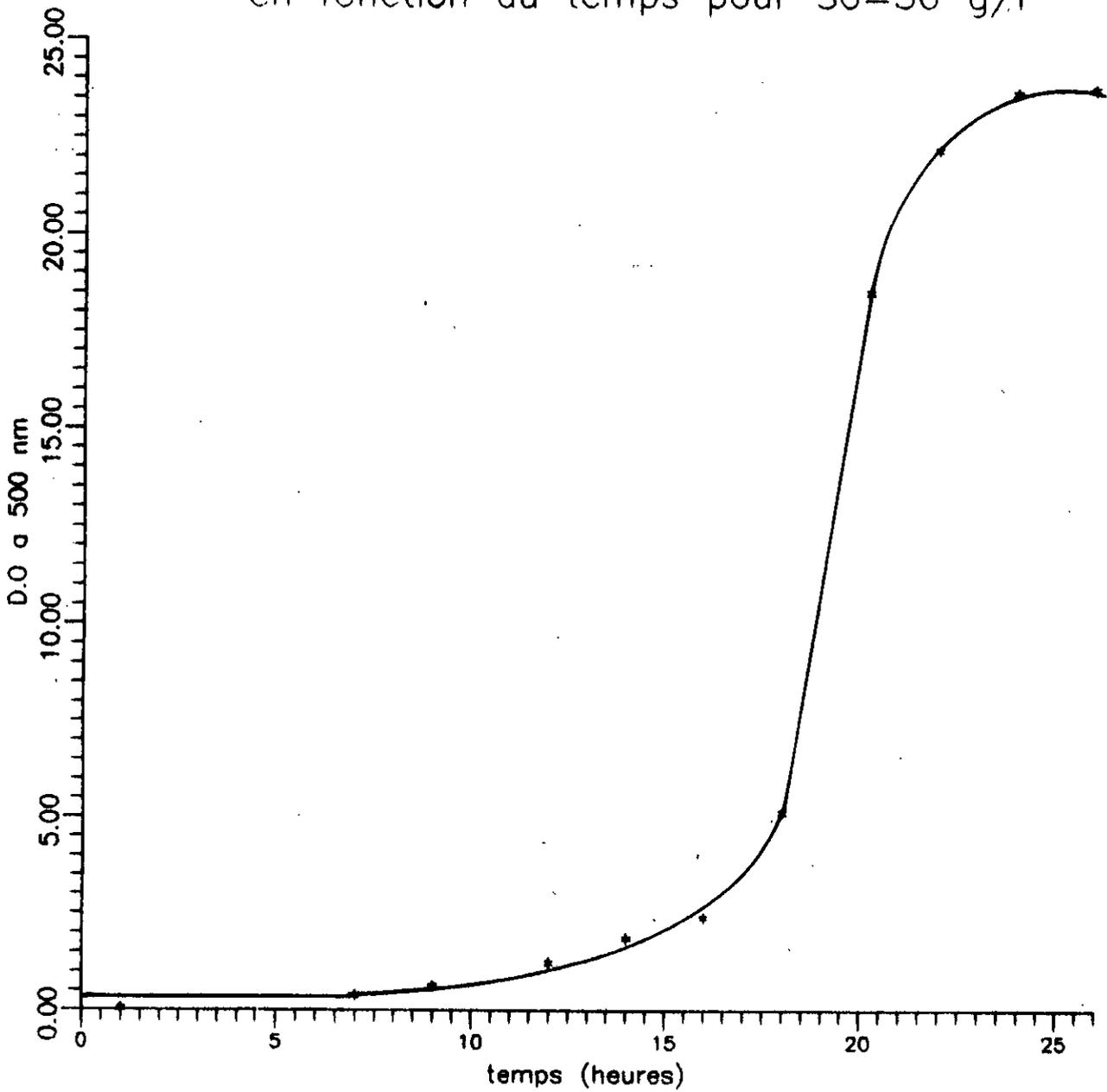
ANNEXE IV

VARIATION DE LA DENSITE OPTIQUE
EN FONCTION DU TEMPS POUR $S_0=20$ g/l



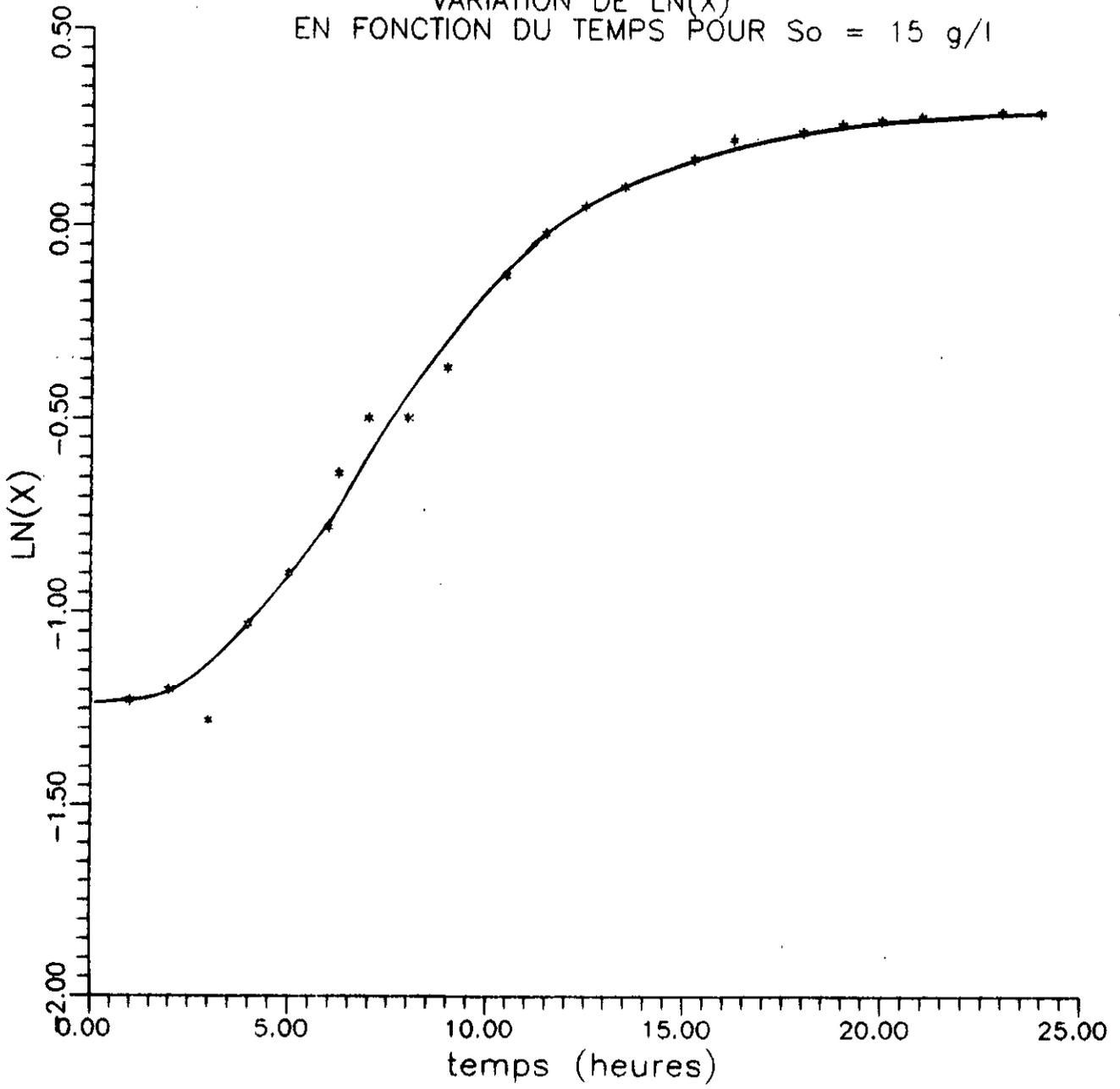
ANNEXE IV

Variation de la Densite Optique
en fonction du temps pour $S_0=30$ g/l



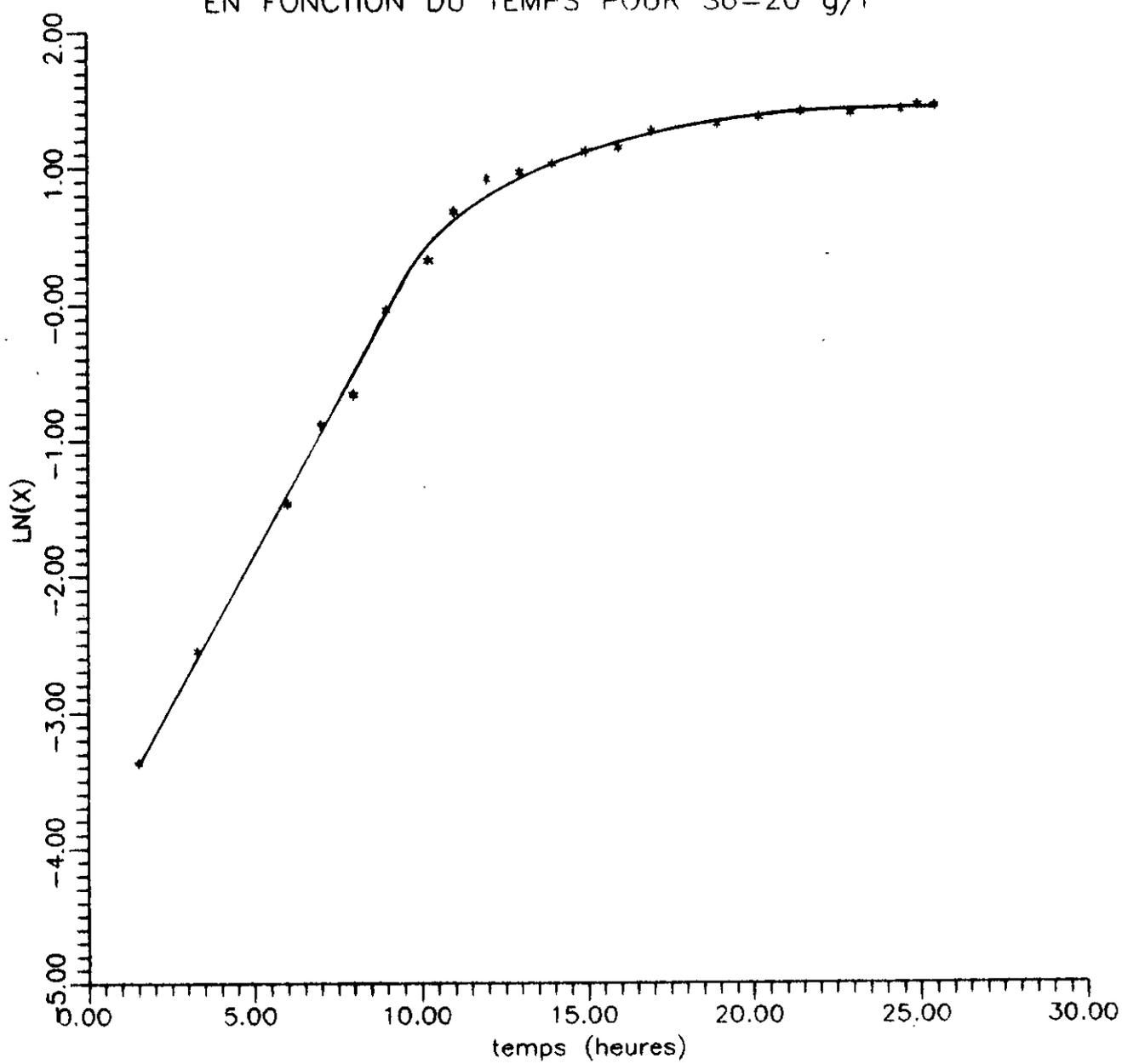
ANNEXE V

VARIATION DE LN(X)
EN FONCTION DU TEMPS POUR $S_0 = 15 \text{ g/l}$

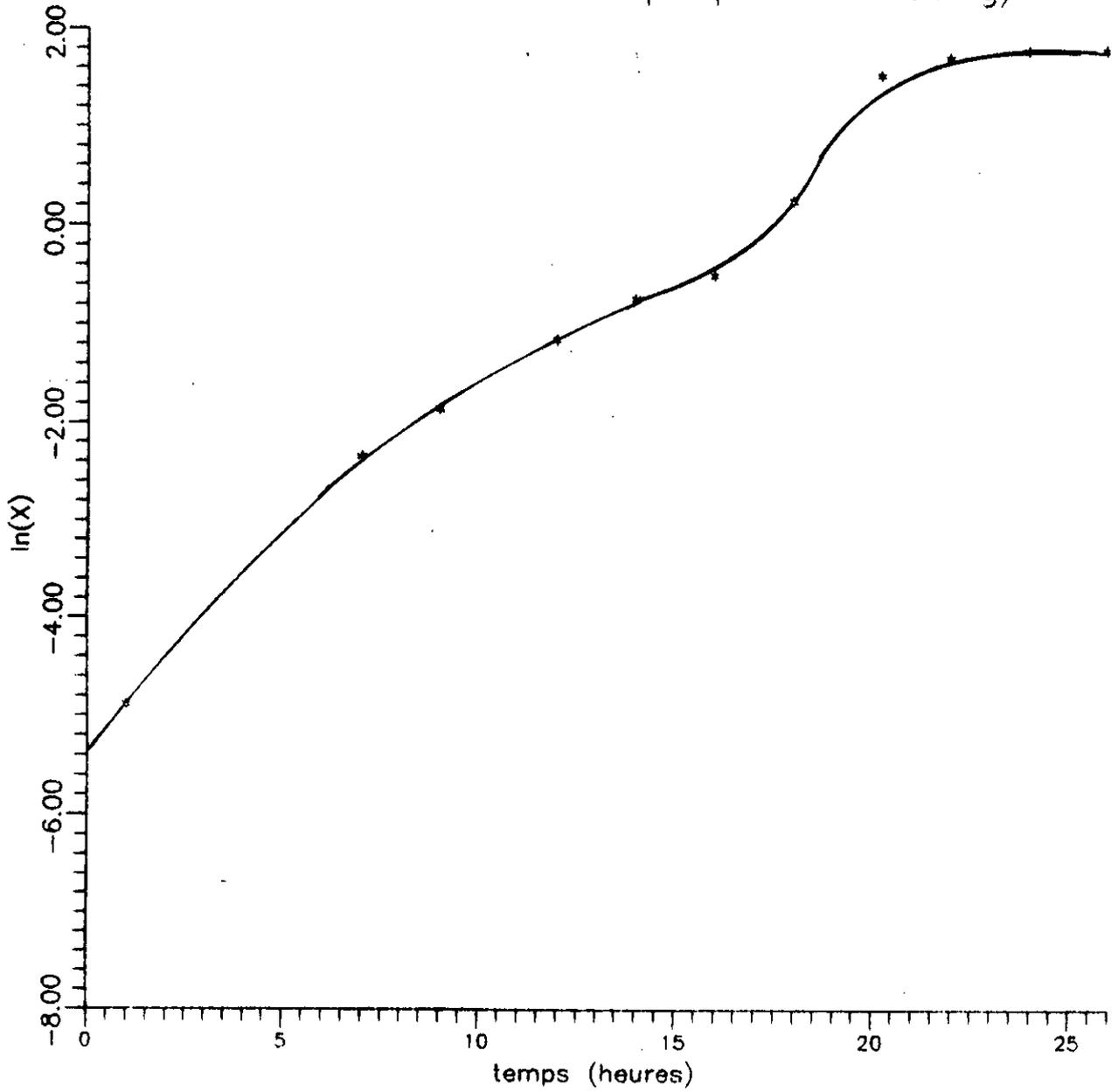


ANNEXE V

VARIATION DE $\text{LN}(X)$
EN FONCTION DU TEMPS POUR $S_0=20 \text{ g/l}$



ANNEXE V
Variation de $\ln(X)$
en fonction du temps pour $S_0=30$ g/l



ANNEXÉ VI

Composition des solutions d'oligo-éléments et de métaux

Solution d'oligo-éléments

pour 1 litre de solution

$\text{Cu SO}_4, 5 \text{ H}_2\text{O}$	4,0 g
$\text{Co Cl}_2, 6 \text{ H}_2\text{O}$	2,8 g
$\text{Na MoO}_4, 2 \text{ H}_2\text{O}$	2,6 g
KI	2,6 g
$\text{H}_3 \text{ PO}_4$	4,0 g

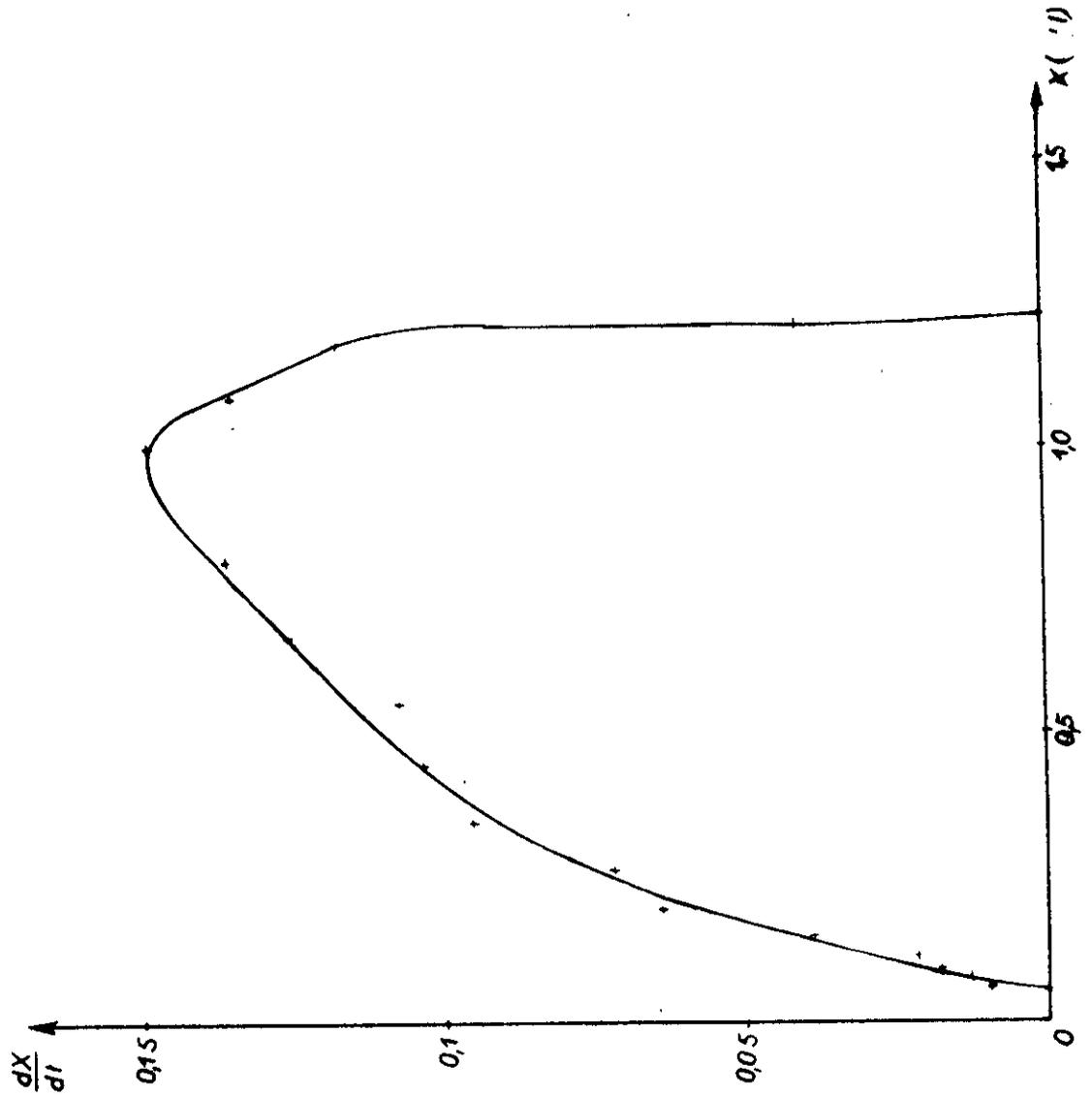
Solution des métaux

pour 1 litre de solution

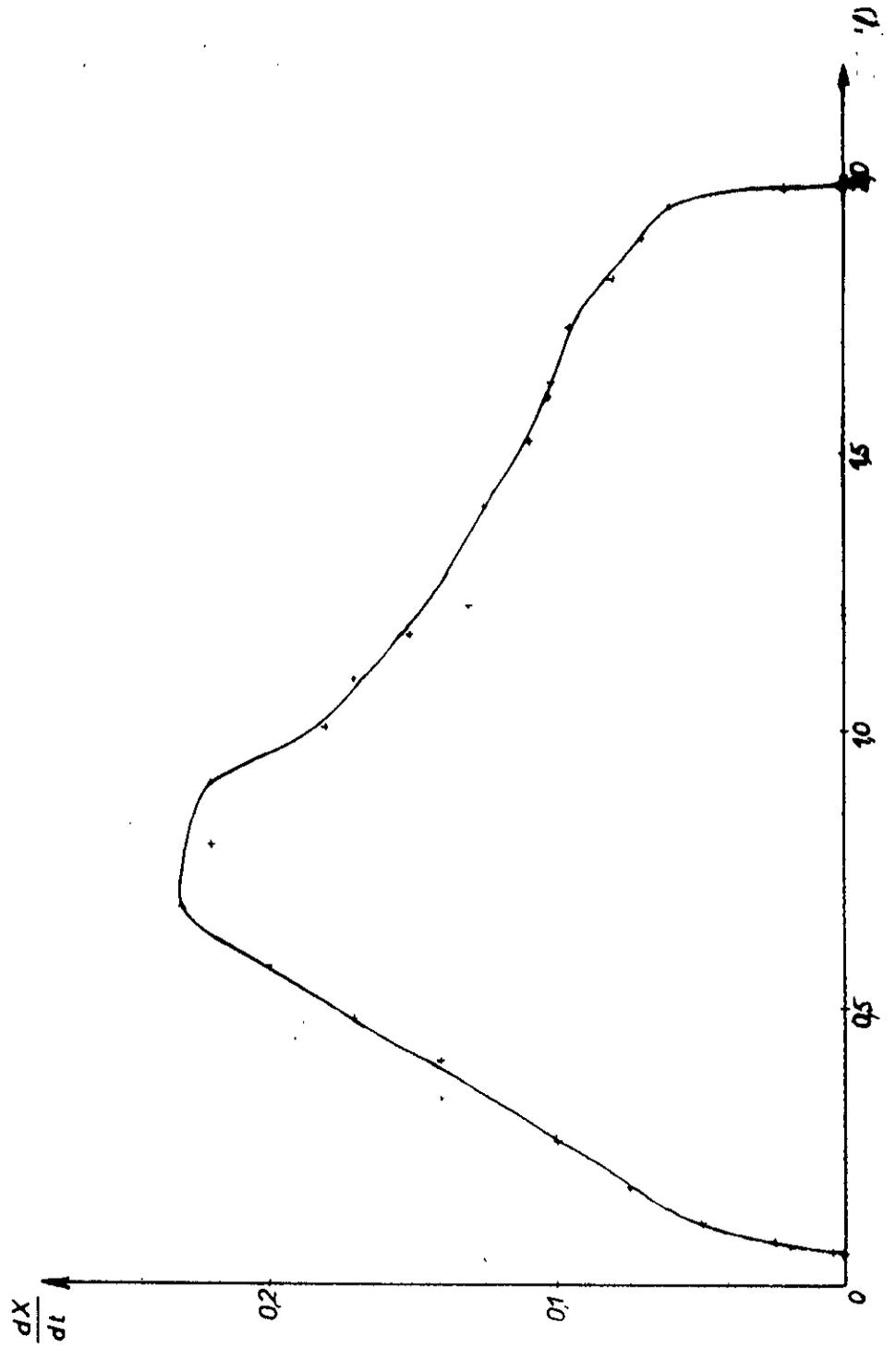
$\text{Mg SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,59 g
$\text{Ca Cl}_2, 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,055 g
$\text{Fe SO}_4, \text{ H}_2\text{O}$	0,0375 g
$\text{Mn SO}_4, \text{ H}_2\text{O}$	0,017 g
$\text{Zn SO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,022 g

ANNEXE VII
Variation de $\frac{dX}{dt}$ en fonction de X pour $S_0 = 5g/l$
Courbe expérimentale

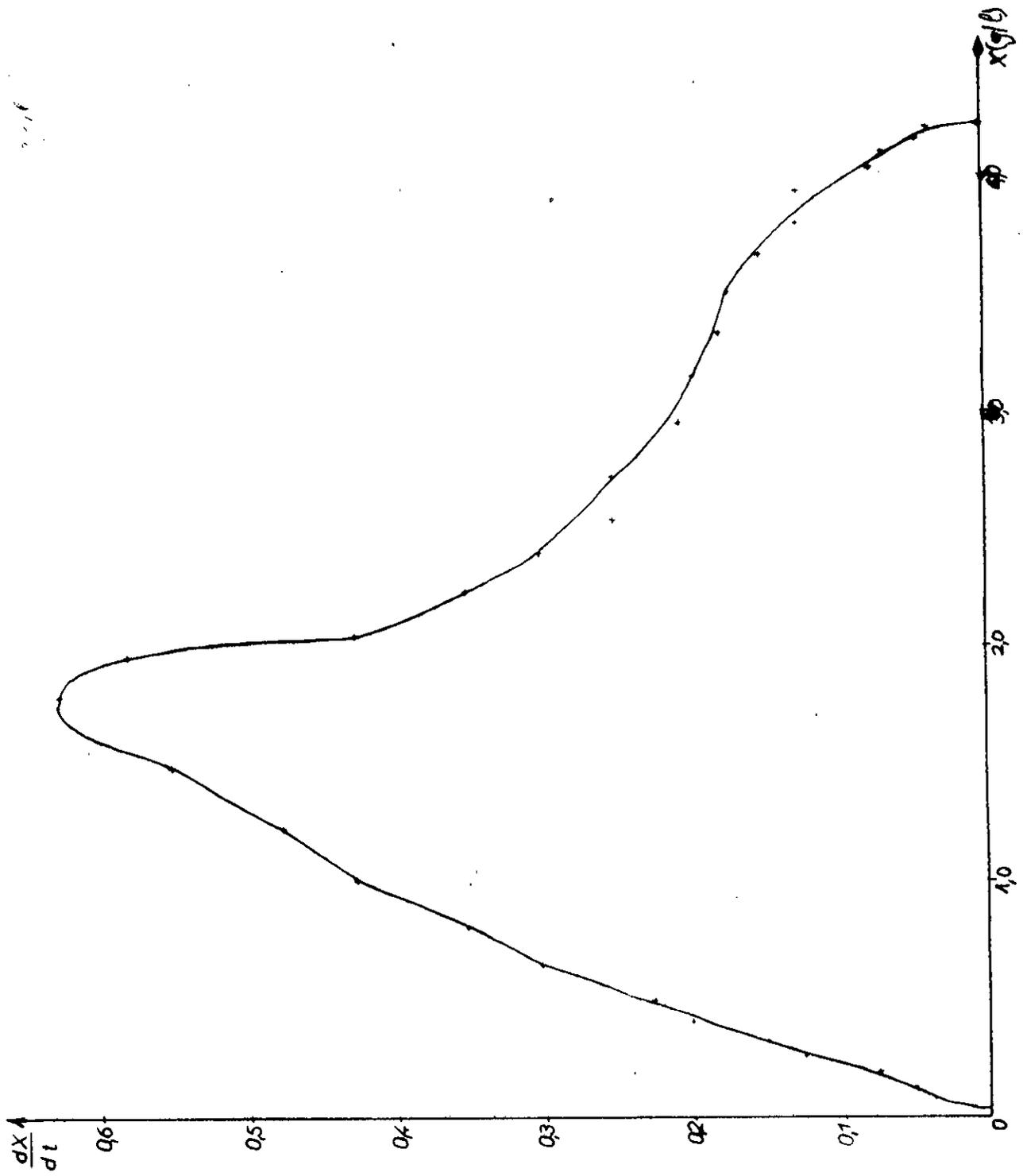
Exp. 1



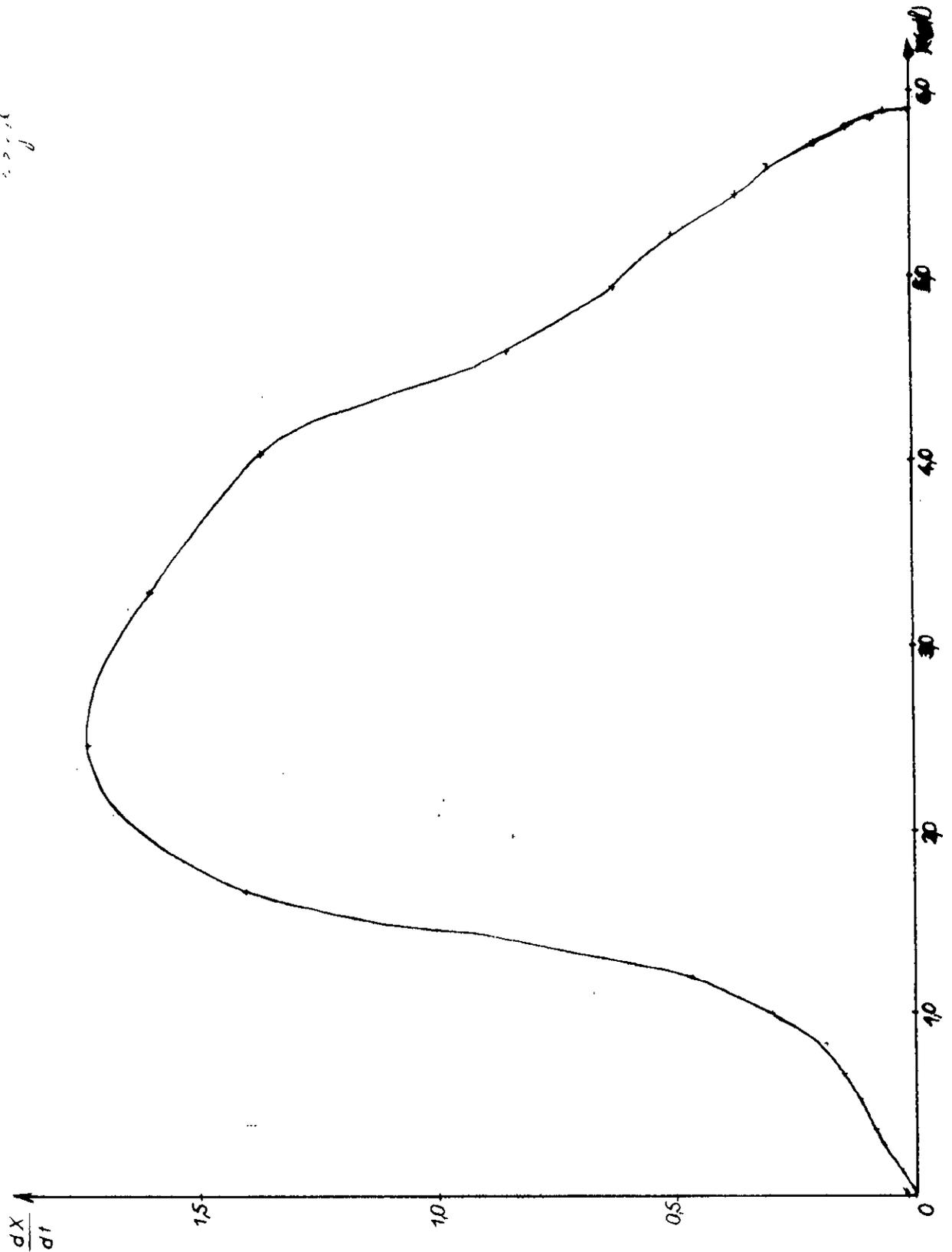
ANNEXE VII
Variation de $\frac{dX}{dt}$ en fonction de X pour $S_0 = 15\text{g/l}$
Courbe expérimentale



ANNEXE VII
Variation de $\frac{dX}{dt}$ en fonction de X pour $S_0 = 20\text{g/l}$
Courbe expérimentale



ANNEXE VII
Variation de dX/dt en fonction de X pour $S_0 = 30\text{g/l}$
Courbe expérimentale



BIBLIOGRAPHIE

- [1] Les applications industrielles de la microbiologie
J. RIVIERE
Editions Masson, 1975
- [2] Les lactosérums: traitements et utilisations
APRIA, Novembre 1973 (côte: 3988)
(APRIA : Association pour la promotion industrie agriculture)
- [3] Biochimie générale
J.H. WEIL
Editions Masson, 1979
- [4] Abrégé de biochimie alimentaire
C. ALAIS, G. LINDEN
Editions Masson, 1987
- [5] Biotechnologie
R. SCRIBAN
Editions Technique et Documentation - Lavoisier, 1988
- [6] Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale
J.-F. BOUDIER, F.-M. LUQUET, C. PIERRE
Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires n°21
APRIA, 1980
- [7] Eléments d'écologie - Ecologie appliquée
F. RAMADE
Edition McGraw Hill, 3^e Edition, 1982
- [8] Les exigences de l'environnement et les fondements des règles de rejet imposées aux industriels.
G. LEYRAUD, L.A. LECLERC, G. SACHON
In Colloque APRIA
Protection de l'environnement - Prévention des nuisances et développement des industries agro-alimentaires.
Edition APRIA, Novembre 83
- [9] Whey Utilization and Whey Products
F.V. KOSIKOWSKI
XX International Dairy Congress, Paris 1978
- [10] Traitement des eaux usées
J.P. BECHAC, P. BOUTIN, B. MERCIER, P. NUER
Editions Eyrolles, 1984

Ouvrages consultés non référencés dans le présent mémoire

- [32] Recueil de normes françaises : Lait et produits laitiers -
Méthodes d'analyse
AFNOR, 1^{ère} édition (1980)
- [33] Principes des méthodes d'analyse biochimique T. I
Cl. AUDIGIE, G. DUPONT, F. ZONZAIN
Doin éditeurs, 1982
- [34] Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.
B. BOTTON, A. BRETON, M. FEVRE, Ph. GUY, J.P.
LARPENT, P.VEAU
Editions Masson, 1985
- [35] Protéines alimentaires
J.-C CHEFTEL, J.-L CUQU, D. LORIENT
Editions Technique et Documentation - Lavoisier, 1985
- [36] Optimisation de la bioproduction de protéines à partir de
lactosérum
R. CHEBINE
Thèse de fin d'études, E.N.P, 1990
- [37] Biotechnologie : Réflexions sur son développement
G. GOMA, P. MONSAN
Séminaire sur les biotechnologies - Alger les 16 et 17 Mai 1983
OPU, 1983
- [38] Vérification du modèle de MONOD sur une culture mixte pour
une bioproduction de protéines sur lactosérum
N. KOUTAI
Thèse de fin d'études, E. N. P, 1990
- [39] Microbiologie pratique
J.-P. LARPENT, M. LARPENT-GOURGAUD
Editions Hermann,; 1970
- [40] Les milieux de culture
N. MARCHAL, J.L. BOURDON, Cl. RICHARD
Doin Editeurs, 1987
- [41] Récupération du lactosérum de l'industrie laitière de
Boudouaou
MARCOS W.
Thèse de fin d'études, E. N. P, 1988

- [42] Cours de microbiologie générale
A. MEYER, J. DEINNA, H. LECLERC
Doin éditeurs, 1984
- [43] Colloque APRIA " Protection de l'environnement - Prévention des
nuisances et développement des industries agro-alimentaires."
22-23 Novembre 1983, APRIA