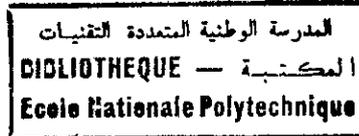


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique****Ecole Nationale Polytechnique****Département de Génie de l'Environnement****Option: Biotechnologie*****Thèse de Magister***

Valorisation du lactosérum par la production de protéines d'organismes unicellulaires à partir de levures locales.

présentée par:***M^{me} Salima KEBBOUCHE******Ingénieur d'état en Génie biologique******Devant le jury:***

M^r R. KERBACHI.....Maître de conférence (ENP).....Président
M^{me} Dj. MAMERI.....Maître de conférence (ENP).....Promoteur
M^r N. MAMERI.....Maître de conférence (ENP).....Co-promoteur
M^r A. TOUZI.....Maître de recherche (CDTN /HCR).....Examinateur
M^{me} K. MOUSSAOUI.....Maître de conférence (ENP).....Examinatrice
M^r M. MOUSSOUS.....Docteur vétérinaire (ONAB).....Invité

Juin -1998

Remerciements

La présente étude réalisée au Laboratoire Central de l'Office National de l'aliment du Bétail -Alger avec la collaboration du Laboratoire des Biotechnologies du Département des Génies de l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique -El-Harrach, a été facilitée par tous ceux et celles qui m'ont dirigé, orienté et soutenu. Je leur exprime ici ma gratitude et ma reconnaissance.

Ma gratitude et mes plus sincères remerciements vont à Madame **Dj. MAMERI**, Maître de Conférence à l'ENP/EL-Harrach, pour la bienveillante direction, les précieux conseils et orientations qui m'ont constamment accompagné et soutenu, durant l'élaboration de ce travail.

Mes remerciements vont, aussi, à Monsieur **N. MAMERI** Maître de Conférence à l'ENP/EL-Harrach, pour avoir témoigné en moi sa confiance, ses recommandations et ses conseils forts intéressants.

Ma reconnaissance et mes remerciements vont, également, à Monsieur **N. BOUASSRIA**, Divionnaire technique à l'O.N.A.B, pour toutes les facilités qu'elle m'a accordé.

Je remercie Monsieur **R. KERBACHI**, Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour avoir accepté de présider ce modeste travail.

Il m'est agréable d'exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur **A. TOUZI**, Responsable du Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Industrielle du Centre de Développement des Techniques Nucléaires (CDTN/MESRS), pour avoir accepté de participer à la critique de ce travail.

Mes remerciements s'adressent, également, à Monsieur **M. MOUSSOUS**, Responsable du Laboratoire Central de l'O.N.A.B pour avoir accepté de faire partie du jury.

A Monsieur **N. MOUSSAOUI**, Maître de Conférences à Ecole Nationale Polytechnique, pour avoir gentillement accepté de faire partie du jury.

Je remercie mon marie **M. L. GANA** pour son encouragement à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont, également à **M. BOUNOUGHAZ**, chef de département corrosion au Centre de Recherche et Développement.

A tous mes collègues du Laboratoire central de l'O.N.A.B **M. ABASSI, Z. AOUCHER, N. LAHLOU, H. ZERROUK, N. LAGOUN, A. DEFFOUS, H. ABELLAOUI, R. MANSOURI, K. IKHLEF, N. A. BOUANANE** et **K. BELMOLEKHAN**.

Ma profonde sympathie va à toutes les personnes et collègues du Département de Génie de l'Environnement de Ecole Nationale Polytechnique. Que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin y trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

تلخيص :

الهدف من هذه الدراسة هو عزل أنواع الخمائر المحلية ذات نمو جيد في مادة اللاكتوسيروم أو مرسوم الخليب لإستغلاله و
تحويله بروتين نكاثفات الأحادي حلية
بعد استعمال مادة الخليب و مشتقاته لعزل الخمائر، لقد تم عزل و التعرف على عشرة (١٠) خمائر مختلفة تنتمي لثلاثة
جنس هي *Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Candida*.

من بين *Kluyveromyces fragilis* نمو الخمائر في وسط غذائي اصطناعي غني بمادة اللاكتوز أدى الى تمييز خميرة
الخمائر الأخرى بمقدورها التفاعل على استعمال اللاكتوز و انتاجها بمادة حبة معتبرة
علاوة عن ذلك لقد تمت التنظية الكاملة لللاكتوسيروم بانخفاض درجة التلوث بعد استعمال الأشنوب المتواض و الغير
التواض.

Résumé

L'objectif de cette étude consiste à isoler des souches de levures locales, ayant une bonne croissance sur le lactosérum, en vue de la production de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U).

L'isolement et l'identification de dix souches de levures différentes, à partir de produits laitiers, nous a permis de mettre en évidence la présence de levures appartenant aux genres *Candida, Kluyveromyces et Schizosaccharomyces*.

La culture des levures isolées sur un milieu de culture synthétique riche en lactose conduit à la sélection d'une levure *Kluyveromyces fragilis* performante, adaptée à la production de biomasse ou de P.O.U.

De plus, d'après les résultats obtenu, l'épuration totale du lactosérum en cultures continues et discontinuées a été réalisée.

Abstract

The aim of this study was an isolation of a local strains of yeasts for production feed yeast or a single cell protein (S.C.P) from cheese whey.

We have isolated ten strains of yeasts from dairy products and identified three different genus: *Candida, Kluyveromyces* and *Schizosaccharomyces*.

A culture of these yeasts on synthetical medium contains only lactose, was showed a best ability and performance of *Kluyveromyces fragilis* to use lactose and to convert it to S.C.P.
More, pollution reduction of cheese whey through yeasts (*Kluyveromyces fragilis*) fermentation was obtained in continous and batch cultures.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES PAR CHAPITRE.....	vi
LISTE DES TABLEAUX PAR CHAPITRE.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
1. Caractéristiques des levures.....	3
2. Cycle biologique des levures.....	3
2. 1. Reproduction Asexuée.....	3
2. 2. Reproduction sexuée.....	4
3. Classification des levures.....	5
3. 1. Critères d'identification des levures.....	5
3. 1. 1. Les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives.....	5
3. 1. 2. Les caractéristiques culturelles des levures.....	5
3. 1. 3. Les caractéristiques sexuelles des levures.....	5
3. 1. 4. Les caractéristiques physiologiques des levures.....	5
3. 2. Méthodes conventionnelles d'identification de levures.....	8
4. Etude du métabolisme des levures.....	9
5. Le lactosérum.....	10
5. 1. Définition et composition du lactosérum.....	10
5. 2. Le lactosérum substrat de fermentation.....	11
5. 3. Utilisation du lactosérum pour la production des levures.....	12
5. 3. 1. Production industrielle de levures lactiques.....	13
5. 3. 2. Production de levures lactiques par le procédé Bel.....	14
5. 3. 3. Aspect réglementaire sur l'utilisation de la levure lactique.....	15
5. 3. 4. Composition biochimique de la levure lactique.....	15
5. 3. 5. Utilisation de la levure lactique.....	18
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES	
1. Isolement et identification de levures locales en vue de la production de d'organismes unicellulaires.....	20
1. 1. Matériel biologique.....	20

1. 2. Milieux de culture utilisés.....	20
1. 3. Milieu de conservation des souches.....	20
1. 4. Méthodes d'identification des levures.....	20
1. 4. 1. Isolement et purification.....	20
1. 5. Etude des caractéristiques culturales.....	21
1. 5. 1. Test de croissance sur milieu liquide.....	21
1. 5. 2. Test de croissance sur milieu solide.....	22
1. 6. Etude des caractéristiques morphologiques.....	22
1. 6. 1. Etude des caractères de la cellule végétative.....	22
1. 6. 2. Test de filamentation.....	22
1. 7. Etude des caractéristiques sexuelles.....	22
1. 7. 1. Test de la sporulation.....	22
1. 7. 2. Observation microscopique des ascospores.....	22
1. 8. Etude des caractéristiques physiologiques.....	23
1. 8. 1. Test de fermentation des sucres.....	23
1. 8. 2. Test d'assimilation des substrats carbonés.....	23
1. 8. 3. Test d'assimilation des nitrates.....	23
1. 8. 4. Test d'osmophilie.....	24
1. 8. 5. Test d'hydrolyse de l'urée.....	24
1. 8. 6. Test d'hydrolyse de la gélatine.....	24
1. 8. 7. Test de résistance à l'actidione.....	24
2. Etude de la cinétique de croissance des levures performantes adaptées à la production des POU.....	24
2. 1. Matériel biologique	24
2. 2. Milieux de culture.....	24
2. 2. 1. Milieu synthétique.....	24
2. 2. 2. Milieu à base du lactosérum.....	24
2. 3. Méthodes analytiques.....	27
2. 3. 1. Détermination de la biomasse.....	27
2. 3. 2. Dosage des sucres résiduels.....	27
2. 3. 3. Dosage de l'éthanol.....	28
2. 3. 4. Dosage de la matière protéique.....	28
2. 3. 5. Dosage de la D. C. O.....	28
2. 4. Bioréacteurs utilisés.....	29
2. 4. 1. le minifermenteur.....	29
2. 4. 2. le Bioréacteurs de 2 litres.....	29
2. 4. 3. le Bioréacteurs de 5 litres.....	30
...2. 5. Stérilisation.....	30

2. 6. Conduite des fermentations.....	30
2. 6. 1. Préparation de l'inoculum.....	30
2. 6. 2. Conduite de la fermentation discontinue	31
2. 6. 2. 1. En minifermuteur.....	31
2. 6. 2. 2. En bioréacteur de 2 litres.....	31
2. 6. 2. 3. En bioréacteur de 5 litres.....	32
2. 6. 3. Conduite de la fermentation continue.....	32
2. 6. 3. 1. Culture en bioréacteur de 2 litres.....	32
2. 6. 4. Rappels sur les principaux paramètres de la croissance microbienne.....	34
 CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS	
1. Isolement et identification des levures locales en vue de la production de P.O.U.....	40
1. 1. Caractérisation du groupe de levures se divisant par scissiparité.....	40
1. 2. Groupe de levures se divisant par bourgeonnement.....	45
2. Culture et sélection de levures performantes pour la production de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U).....	51
2. 1. Culture de <i>kluveromyces fragilis</i> sur lactosérum déproteiné enrichi.....	54
2. 1. 1. Culture discontinue.....	54
2. 1. 1. 1. Culture en minifermuteur.....	54
2. 1. 1. 2. Culture en réacteur de deux litres.....	63
2. 1. 1. 3. Culture en réacteur de 5 litres.....	68
2. 1. 2. Culture continue.....	70
2. 2. Estimation de la réduction de la pollution du lactosérum par mesure de la demande chimique en oxygène (DCO).....	76
CONCLUSION.....	79
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	81
ANNEXES.....	88

LISTE DES FIGURES PAR CHAPITRE

CHAPITRE I<

Figure 1: Structure de la cellule de levure de boulangerie (Saccharomyces cerevisiae).

Figure 2: Rang des levures dans la classification des champignons

Figure 3: Classification des Endomycétales .

Figure 4: Clé dichotomique simplifiée conduisant aux principaux genres de levures.

Figure 5: Le métabolisme du lactose chez Kluyveromyces fragilis.

Figure 6: Dispositif de fermentation et de concentration de la levure

Figure 7: Diagramme de fabrication de la levure

CHAPITRE II

Figure 8: Isolement et purification des levures

Figure 9: lactosérum issu de la fabrication du fromage à pâte pressée non cuite, type EDAM adapté à l'unité Boudouaou et son transport jusqu'au laboratoire

Figure 10: Courbe étalon du dosage des sucres.

Figure 11: Dispositif de fermentation

Figure 12: Schéma de principe d'une culture discontinue

Figure 13: Schéma de principe d'une culture continue

Figure 14: Variation de la concentration de l'oxygène dissous dans un milieu saturé en oxygène en fonction du temps.

Figure 15: Courbe de croissance microbienne

Figure 16: Variation du taux de croissance (μ) en fonction de la concentration en substrat (S).

Figure 17: Variation de la biomasse en fonction du temps :établissement du régime permanent

Figure 18: Détermination graphique de la constante de maintenance

CHAPITRE III

Figure 19: Culture des levures lactiques isolées en minifermementeur sur le milieu Y.P.S.L. Variation de la concentration du lactose en fonction du temps

Figure 20: Culture des levures lactiques isolées en minifermementeur sur le milieu Y.P.S.L. Variation de la biomasse en fonction du temps

Figure 21: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Etude de la cinétique de production de biomasse, d'éthanol et de la consommation du lactose.

Figure 22: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation des vitesses spécifiques de la production de biomasse, de l'utilisation du lactose et du rendement instantané en fonction du temps.

Figure 23: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation du pH en fonction du temps.

Figure 24: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence de la température sur la production de biomasse et sur l'utilisation du lactose en fonction du temps.

Figure 25: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi: Influence de la température sur le taux de croissance et le rendement en biomasse.

Figure 26: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence du pH sur la production de la biomasse et sur l'utilisation du lactose.

Figure 27: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence du pH sur le taux de croissance et le rendement en biomasse.

Figure 28: Culture de la souche Kluyveromyces fragilis en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence de la concentration en lactose sur la production de biomasse et d'éthanol en fonction du temps.

Figure 29: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 800 tr/min.): Variation de la biomasse, de la concentration en lactose et de la production d'éthanol en fonction du temps.

Figure 30: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 800 tr /min.). Variation des vitesses spécifiques de production de biomasse, d'utilisation du lactose et du rendement instantané en fonction du temps.

Figure 31: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 800 tr/min.): Variation de la biomasse et de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps.

Figure 32: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 400 tr/min.) :Variation de la biomasse, de la concentration en lactose et de la production d'éthanol en fonction du temps.

Figure 33: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 400 tr/min). Variation des vitesses spécifiques de production de biomasse, de l'utilisation du lactose et du rendement instantané en fonction du temps.

Figure 34: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 400 tr/min.): Variation de la biomasse et de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps.

Figure 35: Culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en réacteur de 5 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, de l'utilisation du lactose, de la production d'éthanol et de la concentration en oxygène dissous en fonction du temps.

Figure 36: Détermination graphique du K_{la}

Figure 37: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 38: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps

Figure 39: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 40: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 41: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 42: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 43: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose et de l'éthanol à $D = 0,38 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

Figure 44: Culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur le lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse, du lactose, d'éthanol et de la saturation en oxygène dissous en fonction du taux de dilution .

Figure 45: Evolution de $1/D$ en fonction de $1/S$. Détermination de K_S et du taux de croissance maximum (μ_{max})

Figure 46: Estimation de la variation de la biomasse, du lactose et de la productivité horaire en fonction du taux de dilution

Figure 47: Evolution de la DCO en culture discontinue de la souche Kluyveromyces fragilis en fonction du temps.

Figure 48: Evolution de la DCO résiduelle et de l'abattement de la DCO en culture continue en fonction du taux de dilution.

LISTE DES TABLEAUX PAR CHAPITRE

CHAPITRE I

Tableau 1: Composition biochimique du lactosérum.

Tableau 2: Composition moyenne globale de la levure lactique

Tableau 3: Principaux acides aminés de la levure lactique

Tableau 4: Composition moyenne en glucides de la levure lactique

Tableau 5: Répartition des acides gras de la levure lactique

Tableau 6: Répartition des vitamines de la levure lactique.

Tableau 7: Principaux minéraux de la levure lactique

Tableau 8: Composition moyenne en oligo-éléments de la levure lactique.

CHAPITRE III

Tableau 9: Principales caractéristiques des espèces du genre Schizosaccharomyces

Tableau 10: Résultat de l'observation macroscopique des différentes souches de levure isolées

Tableau 11: Résultats de l'observation microscopique des différentes souches de levures isolées.

Tableau 12: Résultats du test de fermentation des sucres des différentes souches de levures isolées

Tableau 13: Résultats du test d'assimilation des composés carbonés et du nitrate de potassium des différentes souches de levures isolées

Tableau 14: Résultats des autres tests physiologiques effectués sur les souches de levures isolées.

Tableau 15: Caractérisation des ascospores des différentes souches de levures isolées.

Tableau 16: Origine des différentes souches de levures isolées à partir de produits laitiers utilisés.

Tableau 17: Paramètres de la cinétique de croissance des levures étudiées sur milieu Y P S. L.

Tableau 18: Composition biochimique en valeurs moyennes du lactosérum utilisé.

Tableau 19: Culture discontinue en minifermuteur de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné enrichi après dilution du lactosérum.

Tableau 20: Résultats obtenus en culture continue de la souche Kluyveromyces fragilis sur lactosérum déprotéiné

Tableau 21: Valeurs calculées de la variation de la biomasse X , du substrat résiduel S et de la productivité horaire en fonction du taux de dilution

Tableau 22: Evolution de la DCO en culture discontinue en fonction du temps.

INTRODUCTION

المعهد الوطني للتحليل
DIRECTION GÉNÉRALE — 10000
École Nationale Polytechnique

I - INTRODUCTION

De grandes quantités de sous produits de l'industrie agro-alimentaire sont rejetés en Algérie dans la nature et constituent dans la plupart des cas des facteurs sévères de pollution. Parmi les industries polluantes, nous nous sommes intéressés à l'industrie laitière. Comme par exemple, la laiterie O.R.L.A.C de Boudouaou qui pour la production fromagère rejette quotidiennement 6000 litres / jour de lactosérum, soit pour chaque kilogramme de fromage produit, un résidu de 4 à 12 kg de lactosérum est rejeté.

De par la richesse de sa composition biochimique, le lactosérum constitue un excellent milieu de culture pour les micro-organismes, ce qui fait de lui un facteur de pollution redoutable (Agnes -1986). En effet, la demande biologique en oxygène d'un litre de sérum varie de 30 à 40 g d'oxygène et peut même atteindre 60 g (Ghaly et Singh -1989). Enfin, sa charge en germes pathogènes constitue un danger permanent pour la santé des citoyens (Rosner -1982).

Néanmoins, le lactosérum peut être considéré comme produit noble et utilisé soit à l'état brut soit à l'état fractionné. Il peut être incorporé dans les aliments destinés à l'homme comme substitut du lait maternel, dans les boissons (Crippen et Jeon-1983), parfois incorporé dans les produits laitiers (Alais -1985), dans les pâtes alimentaires (Towler -1982), en pâtisserie et biscuiterie (Mann -1984), en panification (De La Gueriviere -1981) (a) en charcuterie (Pinel -1981). Enfin, les hydrolysats de protéines et les immunoglobulines sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique (Roger -1981). Par ailleurs, la transformation des constituants du sérum en acide lactique ou en riboflavine constitue, aujourd'hui, un marché limité par rapport à la production d'éthanol par *Saccharomyces fragilis*.

Il est utile de noter que le lactosérum entre dans la composition des rations alimentaires de nombreux animaux d'élevage et du cheptel laitier en particulier (Remond et Coulon 1986).

Pour valoriser ces tonnages élevés de lactosérum, la production par fermentation de protéines d'organismes unicellulaires (POU) pourrait constituer une voie attractive parmi tend d'autres.

Du moment que la production de protéines est insuffisante en Algérie, On a de plus en plus recours à l'importation. Dans le domaine de l'alimentation animale de grandes quantités de tourteaux de soja sont importées tous les ans. Ces dernières constituent une source de protéines évaluée à 53 % de matière azotée à incorporer dans l'alimentation du bétail. Environ 22 000 Tonnes de tourteaux de soja ont été importées en 1996. Ce qui représente l'équivalent de 65 Millions de dollars et ce chiffre progresse malheureusement d'une année à une autre .

Il est important de signaler qu'actuellement les levures sont de plus en plus employées comme appoint protéique. Sur un autre plan, les souches utilisées pour la production de biomasse (levures boulangères) qui sont importées représentent un autre handicap dans la mesure où les pays fournisseurs imposent des rendements de production en corrélation avec les caractéristiques des souches de levures.

Il nous semble par conséquent utile de rechercher des souches locales susceptibles de donner des rendements élevés.

De nombreuses études ont été consacrées à la recherche de nouvelles souches de levures plus performantes et capables de transformer le lactose (principal sucre présent dans le lactosérum) en biomasse.

Pour la transformation du lactose, les levures doivent dégrader complètement et rapidement le disaccharide et le convertir en biomasse par voie aérobie pour l'obtention de rendements élevés.

Dans cette perspective, un grand nombre de travaux ont été menés (**Vananuvat et Kinsella -1975, Moulin et al. -1981, Kallel et al., 1991 et Castrillo et al., -1996**). Parmi ces travaux, certains ont été conduit en partie par addition de nutriments coûteux pour l'optimisation de milieux de culture.

Les souches de levures utilisées ont le plus souvent comme biotope naturel le lait ou les produits laitiers (**Hellal -1983**). Elles appartiennent à différentes espèces et la souche *Kluyveromyces fragilis* est la plus représentative (**Vrignaud -1971**). De nombreux travaux lui sont consacrés dans le but d'optimiser ses conditions de culture (**Wasserman et al., 1958; 1960; 1961, Vananuvat et Kinsella -1975, Moulin et al.,-1981, Sandhu et Waraich -1983, Kallel et al., -1991**).

D'autres levures sont, aussi, capables de croître sur le lactosérum telle que *Kluyveromyces lactis* et *kluyveromyces marxianus* (**Ladet et al., -1972**), *Candida lipolytica* (**Foda -1976**), *Candida utilis*, *Debaromyces hansenii* (**Foda -1976**), *Candida intermedia* (**Bayer et Meyrath -1979, 1983**), *Candida curvata* (**Bassila -1980**) et *Trichosporon cutaneum* (**Osovik et al., 1975**) et peuvent toutes produire de la biomasse.

A cet effet, nous nous sommes proposés d'abord:

- d'isoler et d'identifier des souches de levures locales à partir de divers produits laitiers,
- d'étudier leur comportement vis-à-vis du lactose. Et enfin, les cultiver sur le lactosérum pour une meilleure valorisation de ce sous produit.

Pour cela, il est indispensable que les souches de levures sélectionnées répondent aux critères universellement utilisés à savoir: qu'elles soient aérobies, mésophiles, acidotolérantes et sans exigences nutritionnelles.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Caractéristiques des levures

Les levures sont des champignons microscopiques et se présentent sous forme unicellulaire au moins à un stade de leur cycle biologique. Les cellules sont généralement ovoïdes et leur taille varie de quelques microns à 30 microns. Elles sont largement distribuées dans la nature. Elles sont saprophytes ou parasites et parfois pathogènes.

Les levures se différencient des bactéries par leur structure cellulaire. Elles font partie du règne des eucaryotes. Ce sont des cellules immobiles, de forme variable (ovoïdes, cylindrique, triangulaires) (Davenport -1980).

Leur cytoplasme contient les organites habituels des organismes végétaux supérieurs non photosynthétiques. A savoir, des mitochondries, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique, des ribosomes, des vacuoles et des granules de réserves. Le noyau est limité par une membrane nucléaire et contient des chromosomes dont le nombre varie suivant les espèces. La cellule est protégée par une paroi rigide, de nature essentiellement polysaccharidique (Fig. 1).

2. Cycle biologique des levures

Les levures ont deux modes de reproduction. Une reproduction végétative mitotique, qui se fait par bourgeonnement ou par scissiparité et une reproduction sexuée méiotique qui se fait au moyen des spores.

2. 1. Reproduction Asexuée

Elle se fait soit par scissiparité soit par bourgeonnement. La première implique la duplication des cellules végétatives par formation d'une cloison transversale qui divise les cellules en deux parties égales.

Quand les cellules restent accolées, après plusieurs divisions, elles forment un vrai mycelium. Ce mode de division est une caractéristique typique des *Schizosaccharomycoideae* (Verachtert et De Mot -1990).

La reproduction par bourgeonnement débute par la formation d'une petite invagination à un point de la surface de la cellule mère. Sa taille reste constante, pendant que le bourgeon augmente en taille pour se détacher et donner une nouvelle cellule en fin de reproduction. Cependant, les cellules peuvent rester accolées et donner naissance à un pseudomycélium.

Le bourgeonnement peut être multilatéral chez le genre *Saccharomyces*, bipolaire chez les genres appartenant à la famille des *Nadsonioideae* et comme il peut être ou monopolaire. Chez le genre *Trichosporon*, la reproduction asexuée se fait au même temps par bourgeonnement et scissiparité (Verachtert et De Mot -1990).

2. 2. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée n'existe pas toujours. La plupart des levures qui se multiplient par la voie sexuée sont des *Ascomycètes*. En général, deux cellules haploïdes copulent et donnent un zygote par l'intermédiaire ou non d'une lignée diploïde.

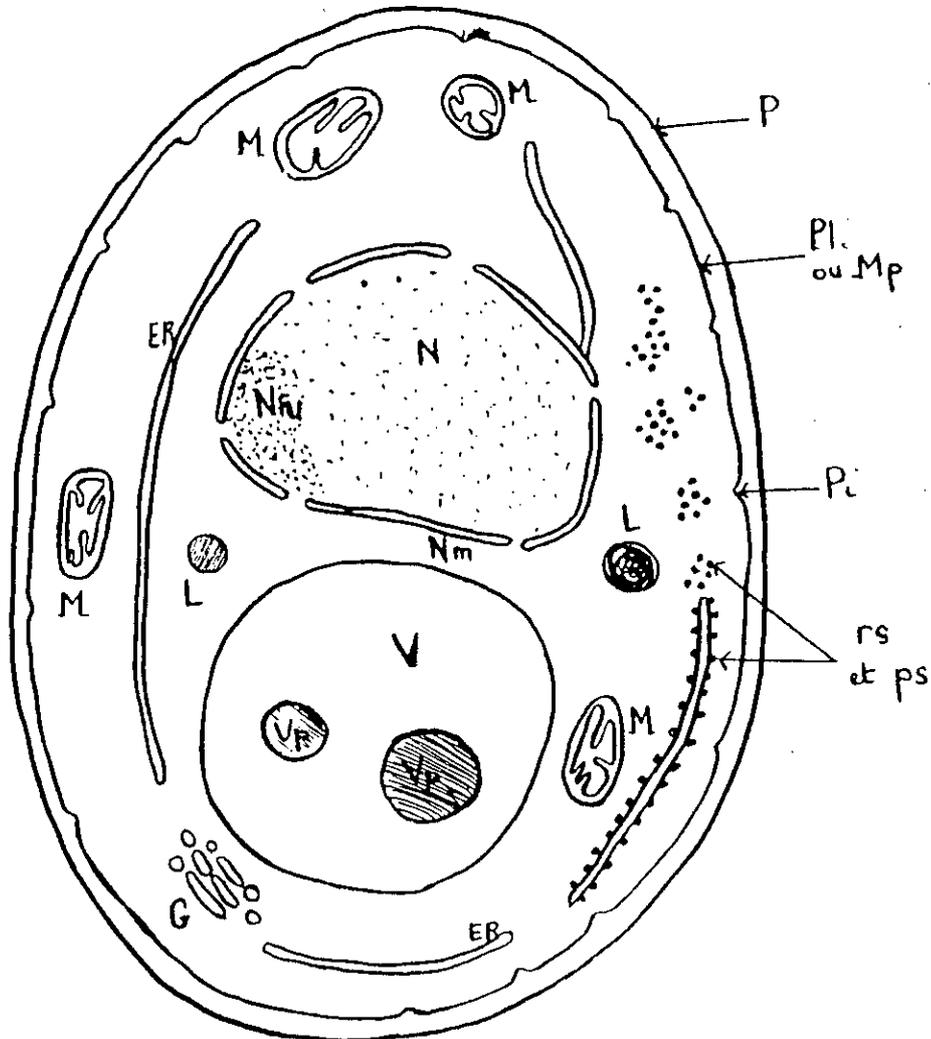


Fig. 1: Structure de la cellule de la levure de boulangerie, *Saccharomyces cerevisiae* (Scriban -1993).

P: paroi; *Pl*: membrane plasmique; *Pi*: invagination; *rs*: ribosome; *ps*: polysome *ER*: réticulum endoplasmique; *G*: appareil de Golgi; *L*: granule lipidique; *N*: noyau; *Nu*: nucléole; *M*: mitochondrie; *Nm*: membrane nucléaire; *V*: vacuole; *Vp*.

Le zygote évolue en asque contenant les ascospores au moyen d'une division méiotique. Par ailleurs, la taille, la position, la forme et le nombre des ascospores varient d'une espèce à l'autre. Il peut y avoir entre 2 et 16 ascospores (Verachtert et De Mot -1990).

3. Classification des levures

Actuellement, la classification des levures la plus reconnue et la plus utilisée est celle proposée par **Lodder (1971)**. Cependant, plusieurs auteurs ont proposé d'autres méthodes d'identification et de classification faisant appel aux tests biologiques. Selon le même auteur, les principales caractéristiques utilisées dans cette classification se basent sur des critères morphologiques, physiologiques et pour une moindre part, génétique. La notion d'espèce est basée sur les similitudes de caractères entre souches. Bien que quelques variabilités soient possibles.

Le même auteur définit le caractère comme étant une réponse d'une levure à un test pratiqué dans des conditions définies. Un changement de ces conditions peut provoquer une réponse différente. Il est donc, nécessaire de comparer les réponses à des tests effectués dans des conditions identiques d'inoculation, de composition du milieu de culture, des conditions d'incubation (temps, température, aérobiose ou anaérobiose) et d'évaluation du résultat.

3. 1. Critères d'identification des levures

Dans cette classification, les critères d'identification retenus par **Lodder (1971)**, sont répartis en quatre groupes:

3. 1. 1. Les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives

Ils comprennent la forme et la taille des cellules examinées en milieu liquide et sur milieu solide. Le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement et la formation de pseudomycélium ou de mycélium vrai.

3. 1. 2. Les caractéristiques culturelles des levures

Les caractéristiques culturelles consistent à définir l'aspect des cultures en milieu liquide tel que la présence de trouble, d'un voile, ou de gaz. Sur le milieu solide, la forme, la taille et la pigmentation de colonies sont les critères retenus.

3. 1. 3. Les caractéristiques sexuelles des levures

Pour les levures ascosporegènes, elles comprennent le mode de formation des ascques, leur forme, le nombre et la forme des ascospores. De plus, la place de la conjugaison dans le cycle de reproduction par rapport à la formation de l'asque est considérée comme critère taxonomique. On parle de cycles haplophasique, diplophasique ou haplodiplophasique.

3. 1. 4. Les caractéristiques physiologiques des levures

Les principaux critères reposent sur la fermentation de composés sucrés et l'assimilation des composés carbonés et azotés. Divers autres caractères peuvent être étudiés tels que la croissance en milieux carencés en vitamines, en milieu à pression osmotique élevée, à température élevée, la production d'acides, de composés extra-cellulaires ou d'esters, l'hydrolyse de l'urée, le clivage des lipides, la formation de pigments, la résistance à l'actidione et la liquéfaction de la gélatine.

Ces critères n'ont pas tous la même importance. Ils sont utilisés dans un ordre déterminé. Ainsi, les caractères morphologiques et sexuels permettent tout d'abord de répartir les levures en quatre ordres appartenant aux trois classes de champignons supérieurs. La Figure 2 illustre la répartition établie par **Lodder (1971)** et reprises par **Barnett et Pankhurst (1974)**. Ces caractères sont utilisés dans une clé dichotomique qui permet de préciser le genre (**Bouix et Leveau -1980**) (Fig.4).

Ainsi, les levures ascosporegènes de l'ordre des *Endomycétales* font partie d'une sous classe des *Ascomycètes*. Pour cet ordre, **Lodder (1971)** propose une classification en quatre familles détaillée dans la Figure 3.

Par ailleurs, **Barnett et Pankhurst (1974)** pensent que la clé proposée par **Lodder (1971)** pour l'identification des levures peut, dans certains cas, conduire à des erreurs. Ils justifient cette thèse par une autre clé d'identification tout en conservant une partie des tests décrits par **Lodder (1971)**.

En effet, l'un des plus importants groupe de levures est constitué par les levures anascosporegènes. Or, **Lodder (1971)** fait de la possibilité de former des ascospores un test très important dans la clé de classification.

Si la levure forme des ascospores facilement observables, l'identification sera possible. Mais souvent, aucune ascospore n'est visible et l'interprétation est alors, difficile et variable. De tout cela, il découle que le test de la formation des ascospores n'est pas satisfaisant, car son interprétation peut ne pas être exacte.

Pour cela, la nouvelle classification ou la ^{''}[new -key] de **Barnett et Pankhurst (1974)** n'applique pas le test des ascospores. Elle utilise en totalité 52 tests tous physiologiques (**Bouix et Leveau -1980**).

Les aspects microscopiques et macroscopiques des levures, la possibilité de former des ascospores sont seulement, utilisées comme critères secondaires dans la procédure d'identification. En utilisant des techniques physico-chimiques, d'autres chercheurs ont étudié la structure biochimique des constituants cellulaires des levures.

Ils ont démontré que, ces structures varient d'une espèce à l'autre (**Bouix et Leveau -1980**). Cela a permis de développer des tests de classification, d'après les propriétés des constituants cellulaires des levures (**Beuchat et al., -1987**).

Parmi ces constituants, les plus étudiés en taxonomie, sont la paroi, le cytoplasme qui contiennent les protéines et les enzymes spécifiques, des bases puriques (pourcentage de guanine et cytosine) du noyau de la souche de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, ce critère sera utilisé pour la taxonomie des levures (**Bouix et Leveau -1980**).

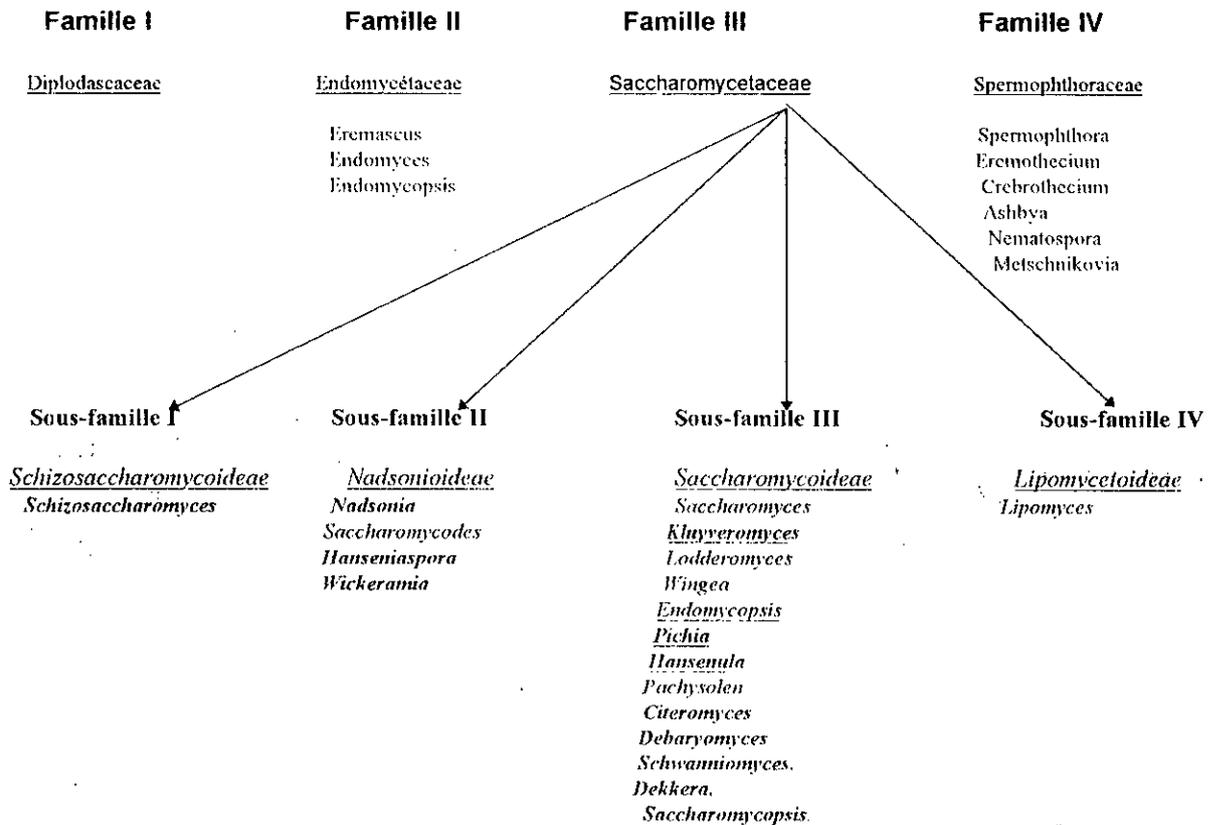


Fig. 3: Classification des Endomycétales (Lodder -1971).

3. 2. Méthodes conventionnelles d'identification des levures

Dans les laboratoires de recherche, les méthodes conventionnelles utilisées pour l'identification des levures peuvent être réalisées, selon deux écoles:

- L'école anglaise qui tient compte essentiellement des aptitudes biochimiques, de fermentation et d'assimilation des sucres ou d'autres substrats et de quelques caractères physiologiques (croissance à 37°C, croissance en l'absence de vitamines...).

Dans ce cas, l'identification de **Barnett et Pankhurst (1974)** est appliquée. De ce fait, des tests en kit sont actuellement commercialisés et largement utilisés pour l'identification des levures rencontrées dans le secteur médical (**Verachtert et De Mot -1990**).

- L'école hollandaise considère l'aspect des cultures en milieu liquide et solide, la forme, la taille des cellules, l'aptitude ou non à la formation de filaments mycéliens ou d'ascospores, la forme et le nombre des ascospores, de la fermentation et l'assimilation des sucres et de divers composés.

L'identification est alors réalisée, selon la clé proposée par **Lodder (1971)**. Cette méthode est appliquée pour l'identification des levures rencontrées dans tous les domaines même celui de l'agro-alimentaire (**Bouix et Leveau -1980**).

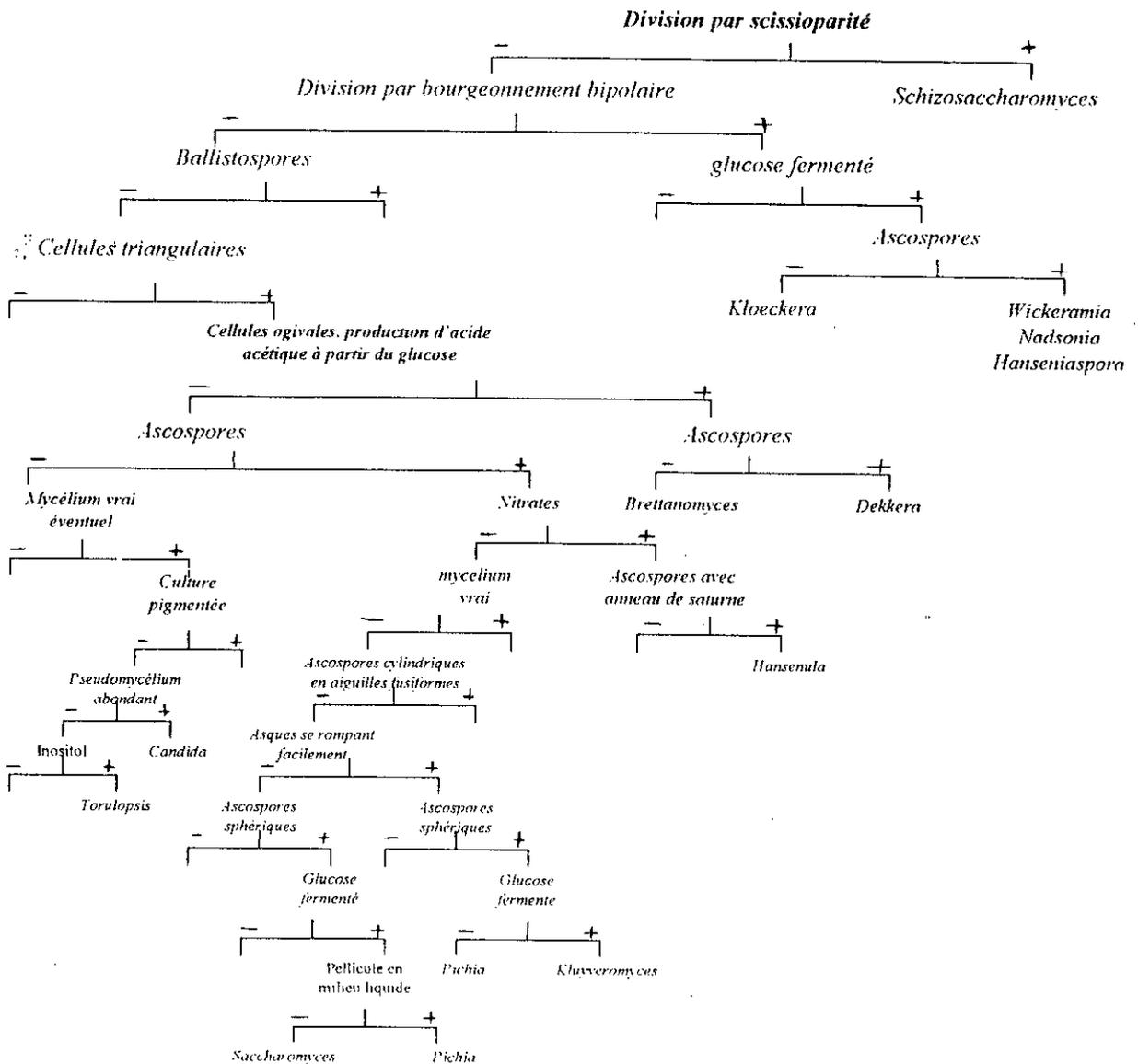


Fig. 4: Clé dichotomique simplifiée conduisant aux principaux genres de levures (Bouix et Leveau 1980).

4. Etude du métabolisme des levures

Les levures sont des hétérotrophes à métabolisme exclusivement oxydatif ou bien à métabolisme mixte oxydatif et fermentaire. Elles sont aérobies et celles qui possèdent, un métabolisme fermentaire ne peuvent se développer en anaérobiose stricte qu'en présence d'ergosterol et d'acide oléique (Nagashima -1990). Les levures sont en général acidophiles. Leur pH optimum de croissance se situe entre 3.5 - 6.5. Mais certaines espèces peuvent se développer dans des milieux très acides et dont le pH peut atteindre la valeur de 1.5.

L'exemple de *Saccharomyces baillir* et *Saccharomyces cerevisiae* (Guiraud et Galzy - 1980). *Saccharomyces telluris* croit dans un intervalle de pH compris entre 0,9- 1,1 (Davenport -1980).

L'influence de la température sur les levures a été étudiée par de nombreux chercheurs. Les résultats obtenus ont montré que la température optimale de croissance est variable et elle est fonction des espèces. Seulement, la plupart des levures se développent à 30°C. D'autres sont thermophiles avec une température minimale de développement de 30°C; ou psychrophiles dont la température optimale est de 10°C pour le genre *Candida curiosa* (Davenport - 1980).

Les levures assimilent de nombreux substrats carbonés par la voie oxydative (glycolyse) du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire génératrice d'ATP, conduisant à la formation de dioxyde de carbone (CO₂) et d'eau (H₂O). La voie fermentaire stricte qui n'existe que chez certaines espèces, conduit à la formation d'éthanol et de CO₂ en empruntant la voie d'Embden -Meyeroff. Seulement, la production d'énergie est très faible. Par contre, chez les levures dotées à la fois d'un métabolisme oxydatif et fermentaire, on observe des possibilités d'autorégulation qui s'exercent en fonction des conditions d'aération du milieu et de sa richesse en sucre (Guiraud et Galzy -1980).

En effet, les travaux de Bourgoies et Leveau (1980) sur l'influence de la concentration en glucose sur le développement des levures ont révélé qu'à la concentration de 5 % en glucose, le métabolisme est fermentaire quel que soit le degré d'aération.

Ce phénomène est dû à l'effet glucose ou effet Crabtree. Par ailleurs, avec une faible concentration en glucose, l'activité fermentaire diminue fortement en présence d'oxygène: C'est l'effet Pasteur.

5. Le lactosérum

5. 1. Définition et composition du lactosérum

En 1980, Boudier et Luquet ont défini le lactosérum comme étant un sous produit de la transformation du lait en fromage, en caséines ou en dérivés de caséine. On peut le définir comme étant du lait exempt de caséine, après coagulation. Il est de couleur jaune verdâtre et contenant de l'eau et toutes les substances solubles: le lactose, les protéines solubles, les sels minéraux, les vitamines et de la matière grasse à l'état de traces.

Selon le même auteur, on rencontre deux types de lactosérums. Les lactosérums obtenus par coagulation du lait par la présure, et provenant de la fabrication des fromages à pâtes pressées cuites et certains fromages à pâtes molles, (l'acidité est inférieure à 18°D). On les appelle les lactosérums doux.

Les lactosérums obtenus par coagulation lactique et provenant soit de la fabrication des fromages de types pâtes fraîches et pâtes molles, ou de la fabrication de caséines lactiques et acides, (l'acidité est supérieure à 18°D) sont les lactosérums acides. Selon Boudier et Luquet (1980), la composition biochimique du lactosérum varie, selon son origine. Les plages de variations sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Composition biochimique du lactosérum, (Boudier et Luquet -1980).

Matière sèche totale	50 à 65 g/l	/
Lactose	39 à 48 g/l	/
Acide lactique	0,5 à 3 g/l	/
Matière azotée	6 à 8 g/l	<ul style="list-style-type: none"> - 65% de matière azotée protéique: <ul style="list-style-type: none"> - Globuline 10 % - Albumine 80 % <ul style="list-style-type: none"> Lactoglobuline 55 % Lactalbumine 20 % Sérumalbumine 5 % - Protéose Peptone 10 % - 35% de matière azotée non protéique <ul style="list-style-type: none"> - Azote uréique ou ammoniacal - Acides aminés libres - Nucléotides.
Sels minéraux	3 à 6 g/l	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , P, Cl ⁻ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , S ²⁻

Dans cette composition, sont retrouvés les vitamines tels que la riboflavine (B₂) qui donne la couleur jaune au lactosérum en se fixant au lactose dissous, la thiamine (B₁), la pyridoxine (B₆), l'acide nicotinique (B₅), la cyanocobalamine (B₁₂), l'acide pantothénique, l'acide folique, la biotine, la vitamine A et la vitamine C.

5. 2. Le lactosérum substrat de fermentation

Dans les pays développés, le lactosérum issu de la production fromagère est récupéré. Ensuite, il subit un traitement technologique par ultrafiltration, par osmose inverse ou par thermocoagulation.

Le fractionnement engendre deux produits d'une grande valeur nutritionnelle. Les lactoprotéines et un jus lactosé. Ce dernier est composé d'eau, de lactose, de vitamines et de sels minéraux. Le lactose extrait du jus et obtenu à l'état cristallisé, subit une hydrolyse chimique ou enzymatique. Il est utilisé en diététique ou en industrie pharmaceutique (**Moulin et al., 1977**). De plus, on produit, à partir du lactose, diverses substances chimiques tels le lactosyl, l'urée, le lactilol et le lactulose.

Par ailleurs, le jus lactosé constitue, dans certaines fermentations industrielles, un milieu de culture de base. Il peut servir à la production de biomasse microbienne à base de levures (procédés Bel/ Wasserman), ou à base de champignons filamenteux (procédés Caliqua / Sireb) (**Fleury et Henriet -1977**). De plus, il est utilisé pour la production de métabolites comme les alcools industriels (**Mahmoud et Kosikowski 1982, Gourseaud -1986**), l'acétone, le butanol (**Welsh -1984**), le méthane (**Camilleri et al., 1986, Kisaalita et al., -1987**), l'acide lactique et la matière grasse (**Moon et al.,-1977**) **Moon et Hammond (1978)**.

Le lactosérum est incorporé dans les substrats de fermentation pour la production de vitamines telles que la cobalamine (B₁₂) (**Marwaha et Kennedy -1983**) et la riboflavine (B₂) (**Jostrom et Hakansson -1953**).

Des enzymes telles que la β galactosidase, les cellulases, les amylases et les protéases sont également produits par voie microbienne, par l'utilisation du lactosérum comme milieu de culture (Boudier et Luquet 1980).

5. 3. Utilisation du lactosérum pour la production de levures

C'est grâce aux travaux de Keiling qu'il a été mis en évidence que, certaines espèces de levures possédaient la propriété d'assimiler le lactose ou le disaccharide de D. galactose $\beta(1-4)$ D glucose (Fig. 5). C'est un glucide massivement présent dans le lait et les sous produits de fromageries (De La Gueriviere -1981) (b).

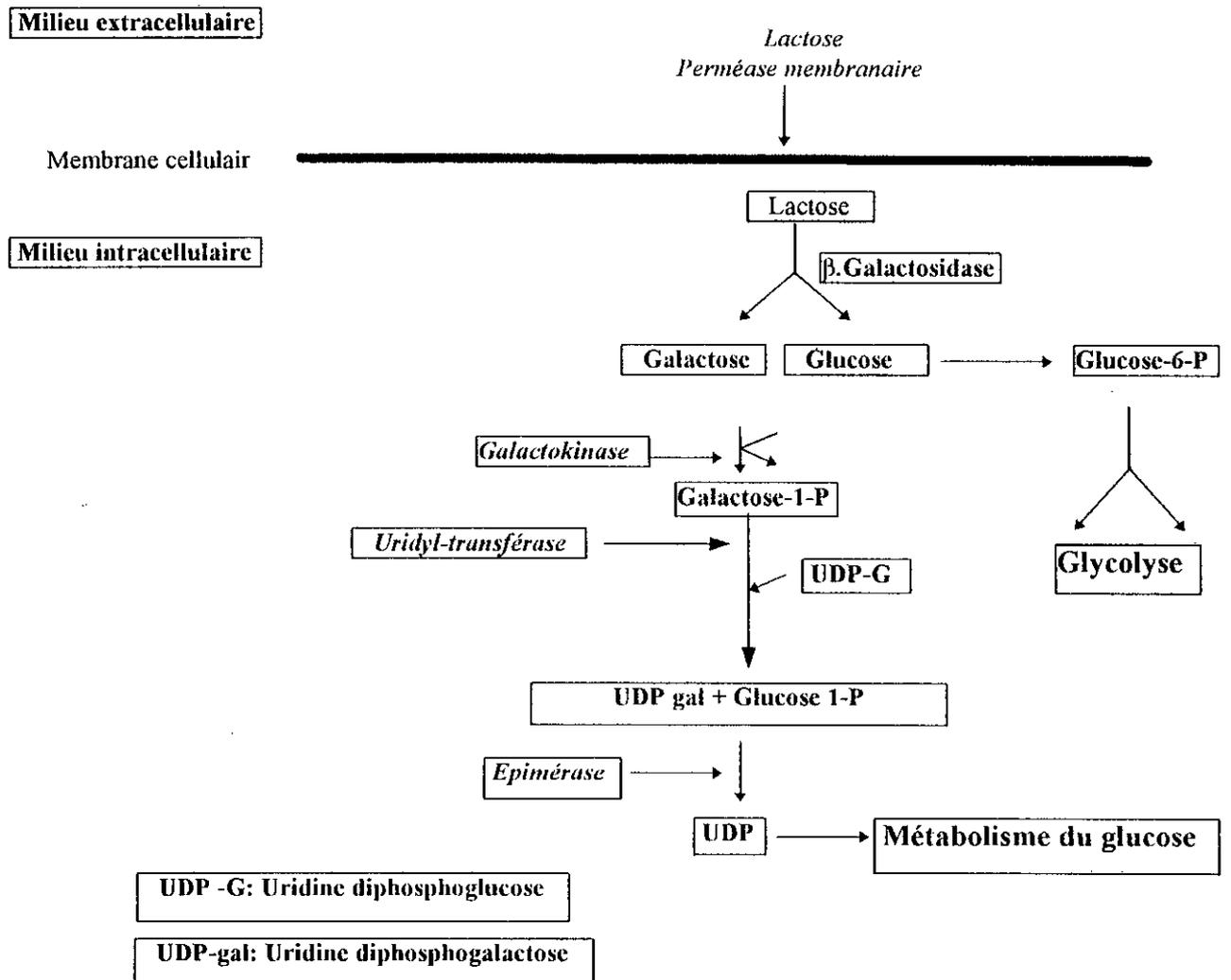


Fig. 5: Le métabolisme du lactose chez *Kluyveromyces fragilis* (Galzy et Guiraud -1980)

Cette découverte constitue un atout déterminant pour les chercheurs de l'industrie fromagère dans leur démarche prospective en vue de valoriser le petit lait ou le lactosérum (De La Gueriviere -1981) (b).

De toutes les fermentations qui utilisent comme substrat le lactosérum, la plus intéressante et la plus étudiée ces dernières années, est celle relative à la production de protéines d'organismes unicellulaires POU, généralement, utilisés en alimentation humaine et animale (De La Guerivière -1981) (a).

5. 3. 1. Production industrielle de levures lactiques

Les procédés industriels de production de levures, à partir de lactosérum, sont divers. On peut citer le procédé (Boudier et Luquet 1980), le Procédé Kiel et de Vienne (Agnes -1986), le Procédé Wasserman, le Procédé Compal (Bargain -1993), et le procédé Bel qui sera détaillé ultérieurement.

5. 3. 2. Production de levures lactiques par le procédé Bel

La société française Bel, en déposant le brevet n° 1.128 063 le 22 Août 1956, a été parmi les premières à mettre en oeuvre une production industrielle de levures à partir du lactosérum (De La Guerivière -1981) (b).

Trois unités fonctionnent actuellement à Vendôme Sablé sur Sarthe installée en 1977 et Saint Brice, traitant 300 000 litres de lactosérum par jour et produisant 8000 tonnes de levures sèches par an (Agnes -1986). Le procédé comprend l'étape de fermentation, la purification par centrifugation - lavage, de concentration avec flash plasmolyse et de séchage (Fig. 6 et 7).

Les substrats utilisés sont des lactosérums déprotéinés par ultrafiltration, originaires des fromageries ou de caséineries, dilués jusqu'à 30 g/l en lactose. La fermentation se déroule en conditions non aseptiques à pH 3 à 34°C et en réacteur continu aéré, monoétage de type airlift (Euzen -1980).

Les levures lactiques cultivées sont *Kluyveromyces fragilis* qui se développe uniquement sur le lactose utilisée à 80 %. L'autre levure cultivée est *kluyveromyces lactis* utilisée à 20 % et qui croit sur le lactose et l'acide lactique. Ces souches sont en équilibre et adaptées au milieu industriel. Ce qui se traduit par des taux de croissance beaucoup plus importants que ceux des souches de collection.

Mais aussi par une étroite dépendance vis-à-vis des conditions de culture, le rendement en biomasse est de 55 %. Le moût de fermentation est soutiré en continu, puis concentré et purifié par centrifugation en deux étapes avec un lavage intermédiaire.

La crème de levure, ainsi obtenue, subit une thermolyse avant d'être concentrée et séchée. La thermolyse permet de régulariser la qualité bactériologique du produit, de détruire les lipases. Ce qui permet, ainsi, une meilleure conservation et d'améliorer la digestibilité du produit (Boudier et Luquet -1980). En effet, le coefficient d'utilisation digestive (C.U.D) atteint 94 % pour l'azote et 92% pour les calories (Bel Industries -1997).

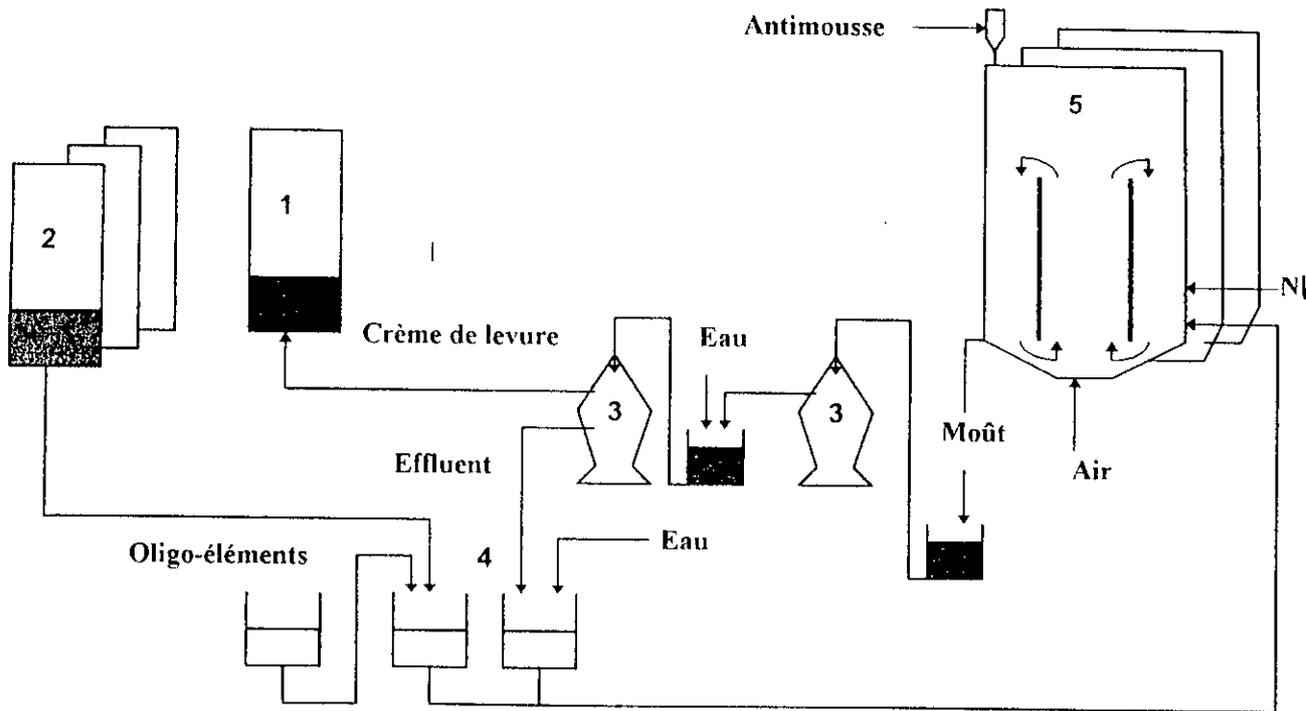


Fig. 6: Dispositif de la fermentation et de la concentration de la levure lactique (Trystram, 1991). (1): Bac de stockage; (2): Bac du substrat carboné; (3): Séparateur-centrifuge; (4): Bac mélangeur; (5): fermenteur.

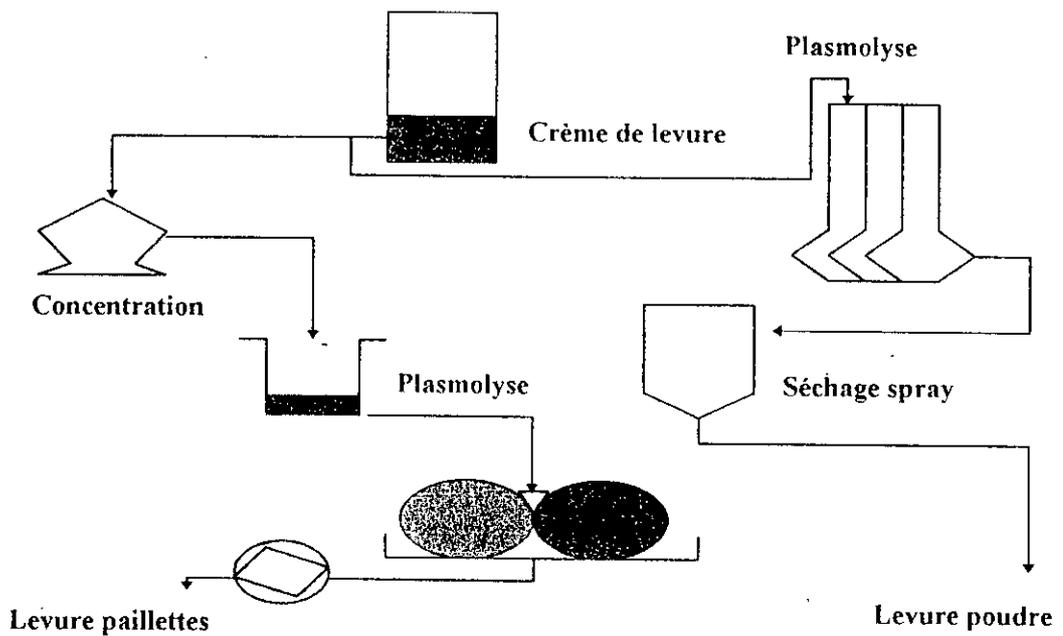


Fig. 7: Diagramme de fabrication de la levure (Trystram et al., -1991).

Le conditionnement de la levure se fait sous la forme de poudre fine séchée en Spray ou en paillettes séchées sur rouleaux (Trystram et al.,-1991).

Conduit, dans des conditions rigoureusement contrôlées, le processus du procédé Bel permet d'obtenir des levures aliments de haute qualité nutritive.

5. 3. 3. Aspect réglementaire de l'utilisation de la levure lactique

Avant d'envisager les différentes applications présentes ou prévisibles de la levure lactique en alimentation, il est important de bien la situer sur le plan réglementaire.

Pour être classer dans les levures aliments, il fallait qu'elles répondent strictement aux critères prévus par l'avis du Parlement Européen publié au J.O du 8 Janvier 1979 (De La Gueriviere -1981) (b).

1. Il est tout d'abord stipulé que les levures aliments doivent avoir perdu leur pouvoir fermentaire par des traitements appropriés. Elles ne doivent, en sus, n'avoir subi ni extraction, ni ajout. La description sommaire du mode de production a montré que tel est bien le cas.

2. Toute levure aliment destinée à l'homme doit renfermer au minimum 49 % de protéines. La levure lactique en contient entre 50 et 52 % (Tableau 2) (De La Gueriviere -1981) (c).

*Tableau2: Composition globale moyenne en (g/100g) de la levure lactique
(De La Gueriviere -1981)(b).*

<i>Humidité</i>	<i>4,5</i>
<i>Matières protéiques (Nx6,25) (dont ARN + ADN : 6)</i>	<i>50,0</i>
<i>Glucidés</i>	<i>30,3</i>
<i>Lipides</i>	<i>6,0</i>
<i>Minéraux</i>	<i>8,1</i>
<i>Choline</i>	<i>0,5</i>
<i>Glutathion</i>	<i>0,5</i>
<i>Vitamine groupe B</i>	<i>0,07</i>

5. 3. 4. Composition biochimique de la levure lactique

Quelle que soit l'espèce à laquelle elles appartiennent, la richesse des levures lactiques en substances carbonées, azotées, minérales et vitaminiques n'est pas négligeable et elle est à la base de leur grande valeur nutritionnelle.

5. 3. 4. 1. Protéines et acides aminés

Les protéines, éléments principaux (48 à 52 %) sont très proches des protéines par la répartition des acides aminés comme le montre le Tableau 3.

Tableau 3: Principaux acides aminés en gramme pour 100g d'azote de la levure lactique (Bel industries -1997).

<i>Acide aminé</i>	<i>Concentration en valeur moyenne</i>
Lysine	7,35
Méthionine	1,35
Cystine	1,20
Tryptophane	1,05
Valine	5,25
Leucine	7,20
Isoleucine	4,55
Histidine	1,90
Thréonine	5,15
Phénylalanine	4,20
Acide aspartique	8,70
Proline	4,30
Glycine	4,30
Tyrosine	3,60
Arginine	4,80
Alanine	5,50

5. 3. 4. 2. Glucides

Les glucides représentent en moyenne 27,5 à 32,5 % des constituants des levures. La composition moyenne est donnée dans le Tableau 4 (en %), (**Bel Industries -1997**).

Tableau 4: Composition moyenne en glucides en (%) de la levure lactique (Bel industries 1997)

<i>Glucose, fructose, galactose</i>	0.25
<i>Mésoinositol</i>	0.05
<i>Glycogène</i>	5
<i>Galactomannane</i>	6
<i>Glucogalactane</i>	14
<i>Glucomannane</i>	5

On remarque la présence du mésoinositol parmi les composants, c'est un facteur important de protection de la cellule hépatique dont l'action s'ajoute à celle de la choline.

En étant composés de molécules de glucose et de galactose, ces polysaccharides sont digestibles à 80 % environ. Par la progressivité de leur absorption par l'organisme, ces glucides particuliers sont bien supportés par les diabétiques.

5. 3. 4. 3. Les lipides

Les matières grasses des levures lactiques représentent 3 à 7,5 % des constituants de la levure lactique comme le montre le Tableau 5. La composition de cette matière grasse est très proche de celle du lait.

Elle a une teneur élevée en acides gras polyinsaturés dont l'importance biologique n'est plus à démontrer pour la formation du système nerveux central et des phanères.

Tableau 5: Répartition des acides gras en mg pour 100g de la levure lactique (Bel Industries -1997).

<i>Acides gras</i>	<i>Valeurs moyennes extrait à chaud</i>
Acide butyrique C ₄	10
Acide laurique C ₁₂	5
Acide myristique C ₁₄	30
Acide pentadecanoïque C ₁₅	20
Acide palmitique C ₁₆	575
Acide palmito-oléique C ₁₆	180
Acide heptadécanoïque C ₁₇	50
Acide stéarique C ₁₈	85
Acide oleique C ₁₈	985
Acide linoléique C ₁₈ ^ω	705
Acide linoléique C ₁₈ ^ω	250
Acide arachidonique C ₂₀	5

5. 3. 4. 4. Vitamines

Elles sont représentées par le groupe B complet et par la vitamine C. Il est très important de savoir que ces vitamines, dans le contexte naturel, s'oxydent beaucoup moins que la plupart des vitamines d'extraction ou de synthèse et conservent ainsi beaucoup plus longtemps leur efficacité (Tableau 6).

Tableau 6: Répartition des vitamines en mg pour 100g de levures lactique (Bel Industrie ,1997).

<i>Thiamine (B₁)</i>	<i>1,0 à 1,5</i>
<i>Riboflavine (B₂)</i>	<i>2,5 à 5,0</i>
<i>Acide Pantothenique (B₅)</i>	<i>8,0 à 15,0</i>
<i>Pyridoxine (B₆)</i>	<i>0,8 à 1,2</i>
<i>Biotine (B₈)</i>	<i>0,04 à 0,09</i>
<i>Cyanocobalamine (B₁₂)</i>	<i>0,0005 à 0,0015</i>
<i>Nicotinamide (PP)</i>	<i>35 à 45</i>
<i>Acide Folique</i>	<i>1,80 à 2,50</i>
<i>Acide ascorbique (C)</i>	<i>20 à 30</i>
<i>Tocophérol (E)</i>	<i>25 à 45</i>

5. 3. 4. 5. les minéraux

La levure lactique est peu minéralisée, entre 6,5 et 8,5 en moyenne. Ces matières minérales fixées par la cellule sont assimilables et comprennent une partie importante d'oligo-éléments indispensables à l'activité enzymatique et à l'efficacité des vitamines. Ils comprennent, à titre indicatif les concentrations suivantes (Tableau 7) exprimé par (g/100g) de levure (Bel Industries -1997).

Tableau 7: Principaux minéraux en (g/100g) de la levure lactique.

Calcium (Ca^{2+})	0,15 à 0,20
Phosphore (P^{2+})	1,7 à 2,2
Sodium (Na^+)	0,1 à 0,25
Potassium (K^+)	2,2 à 2,45
Magnésium (Mg^{2+})	0,1 à 0,15

La composition détaillée en oligo-éléments et en métaux lourds est représentée dans le Tableau 8. Ce bref examen des constituants de la levure lactique met en évidence la valeur biologique de ce produit et l'intérêt qu'il représente pour l'alimentation humaine et animale.

**Tableau 8.: Composition moyenne en oligo-éléments (en ppm)
(Bel-Industries -1997).**

Oligo-éléments	Concentration
Fer (Fe)	60
Manganèse (Mn)	0,5
Cuivre (Cu)	25
Cobalt (Co)	0,5
Zinc(Zn)	45
Molybdène (Mo)	0,3
Nickel (Ni)	0,5
Titane (Ti)	0,40
Aluminium (Al)	0,7
Chrome (Cr)	0,5
Rubidium (Rb)	0,5
Lithium (Li)	0,3
Baryum (Ba)	0,008
Sélénium (Se)	0,02
Métaux lourds	
Plomb (Pb)	inf à 0,4
Arsenic (As)	inf à 1
Etain (Sn)	inf à 0,8
Cadmium (Cd)	inf à 0,1
Mercure (Hg) -	inf à 0,01

5. 3. 5. Utilisation de la levure lactique

La levure lactique utilisée à des fins alimentaires doit répondre à des normes rigoureuses en matière de composition biochimique et chimique. Sa qualité bactériologique doit être aussi prise en considération (Biroulaud -1971).

5. 3. 5. 1. En alimentation humaine

Avant de généraliser son utilisation, des expériences sur l'homme ont montré que le taux de digestibilité de la levure lactique était de l'ordre de 80 - 90 % (**De La Gueriviere -1981**) (c). Sa capacité de rétention d'eau et son pouvoir liant et cohésif remarquables explique sa large commercialisation sous forme de comprimés ou de granulés notamment en pharmacie et dans la confection des miellés charcutières en industrie alimentaire (**Agnes -1986**).

Elle est utilisée en alimentation infantile et en panification; sa richesse en acide glutamique lui confère un rôle d'extenseur et de fixateur d'arôme (**De La Gueriviere -1981**) (c).

La levure-aliment est utilisée comme complément protéique. En effet, dans les pays souffrant de la faim, tous les essais ont été couronnés de succès tant sur le plan de l'acceptabilité que des résultats nutritionnels (**Biroulaud et Vrignaud -1982**). Il a été montré qu'une consommation journalière de 20 g de levure par enfant et de 30 g par adulte suffit de contrer les maux dont souffrent les populations mal nourries (**De La Gueriviere -1981**) (c).

5. 3. 5. 2. En alimentation animale

Connaissant sa richesse vitaminique et protéique, la levure lactique est largement utilisée en alimentation animale.

En effet, elle peut être incorporée à un taux de 6 à 8 % dans les formules nutritionnelles de veaux de boucherie. Ce qui permet de remplacer 12 à 15 % de lait écrémé chez le veau d'élevage. Le taux d'incorporation peut atteindre 20 %. L'équilibre en glucide est assuré grâce à un apport de poudre de lactosérum (**Biroulaud et Vrignaud -1971**).

Le potentiel d'application de la levure lactique s'est élargi aux animaux familiers, et plus récemment en aquariophilie, pisciculture et aquaculture (**De La Gueriviere -1981**) (c).

CHAPITRE II
MATERIELS & METHODES

CHAPITRE II: MATERIELS et METHODES

1. Isolement et identification de levures locales

1. 1. Matériel biologique

Les souches de levure étudiées sont isolées à partir de divers produits laitiers commercialisés en Algérie. Il s'agit du lait pasteurisé, du lait de vache cru, du yaourt, du fromage à pâte molle et du fromage à pâte pressée, ainsi que du lactosérum doux provenant de l'unité O. R. L. A. C de Boudouaou -Boumerdès.

1. 2. Milieux de culture

Pour l'identification, nous avons adopté les méthodes classiques établies par **Lodder (1971)**. Pour cela, nous avons utilisé des milieux de culture spécifiques dont la composition est donnée en Annexes. Il s'agit des milieux suivants:

Milieu d'enrichissement (solide et liquide) à base de lactose contenant des antibiotiques,

Milieu de purification contenant des antibiotiques,

Milieu Wickerham pour l'étude de la Fermentation des sucres,

Milieu auxanogramme pour l'assimilation des sucres,

Milieu pour l'assimilation des nitrates,

Milieu de croissance sur milieu solide,

Milieu de croissance sur milieu liquide,

Milieu PDA pour l'étude de l'aptitude à la filamentation,

Milieu de présporulation,

Milieux pour l'étude de la sporulation:

Milieu Fowell, milieu Mc Clary, milieu Gorodkova et la gélose à l'extrait de Malt

Milieu pour l'étude de l'osmophilie,

Milieu Christensens pour l'hydrolyse de l'urée,

Milieu Sabouraud additionné d'actidione pour l'étude de la résistance à ce composé,

Milieu pour l'hydrolyse de la gélatine.

Tous ces milieux sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 15 mn.

1. 3. Milieu de conservation des souches

Les souches isolées sont conservées à + 4°C sur milieu Sabouraud gélosé, incliné dont la composition est donnée en annexe. Des repiquages sont effectués, chaque mois pour permettre aux souches de levures isolées de maintenir leur vitalité.

1. 4. Méthodes d'identification des levures

1. 4. 1. Isolement et purification

Les levures sont isolées par une technique d'enrichissement et de purification sur les milieux liquides et solides. Afin d'inhiber la croissance des bactéries, ces milieux sont rendus sélectifs par addition d'un antibiotique (l'oxytétracycline). La procédure détaillée de l'isolement et de la purification des levures est donné dans la Figure 8.

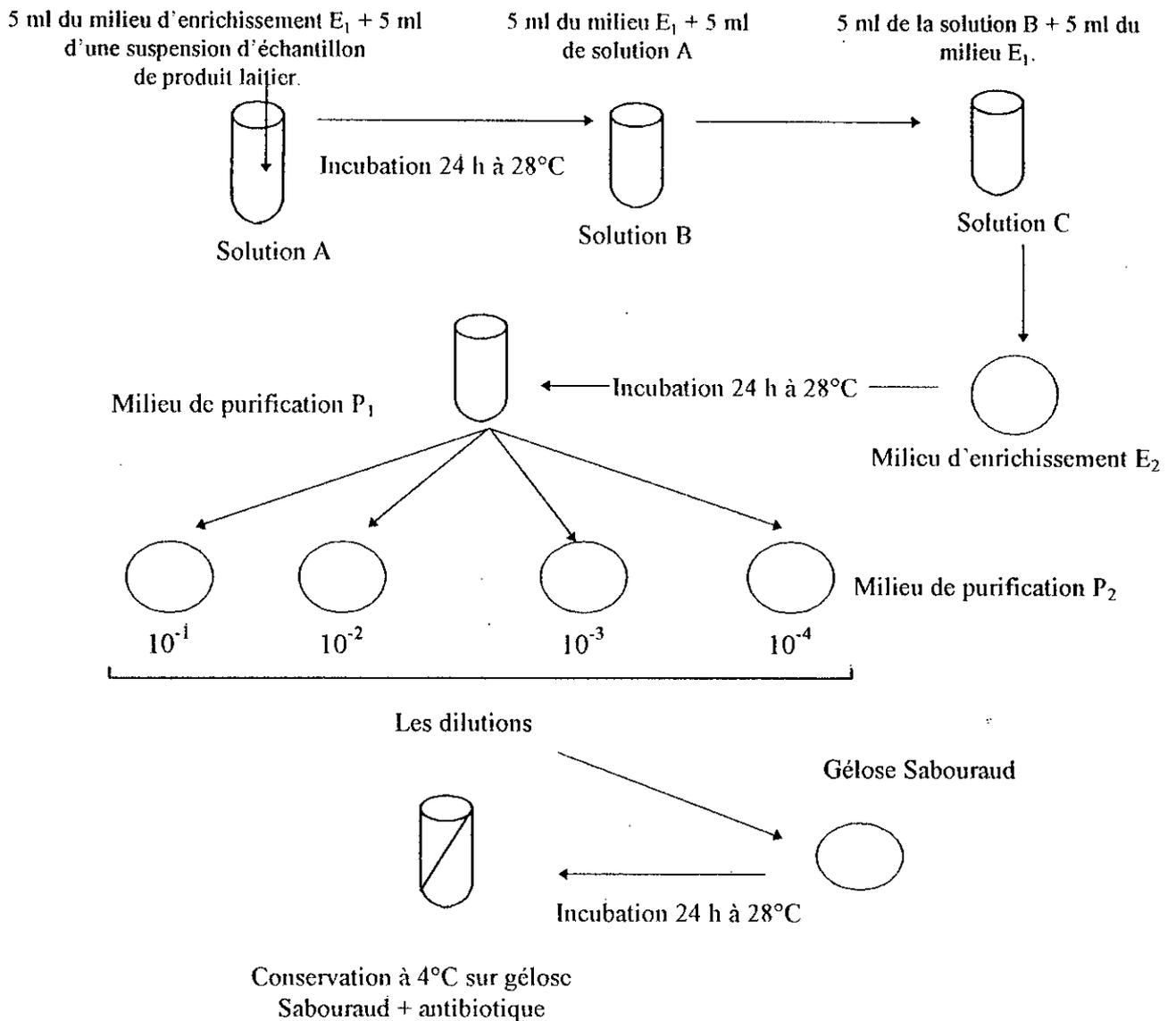


Fig. 8: Isolement et purification des levures (Moukil -1988).

1. 5. Etude des caractéristiques culturales

Il s'agit d'examiner l'aspect des cultures en milieu liquide et solide, après une incubation de 3 jours à 28°C .

1. 5. 1. Test de croissance sur milieu liquide

Les cultures sont effectuées dans des tubes à essai contenant 10 ml de milieu de culture liquide. Ces derniers sont ensemencés, puis incubés pendant 3 jours à 28°C . L'observation de la culture permet de déceler la présence de pellicules, d'un anneau, de sédiments ou de la formation d'un voile à la surface du milieu. Après examen des cultures, elles sont gardées à une température ambiante et réexaminées une deuxième fois, après un mois de conservation.

1. 5. 2. Test de croissance sur milieu solide

Les cultures sont effectuées sur un milieu solide en boîte de Pétri. L'ensemencement se fait par stries. La lecture nous permet d'observer la taille des colonies, leur forme (contour net ou irrégulier), (convexe ou concave), leur aspect (mat ou brillant) et leur pigmentation.

1. 6. Etude des caractéristiques morphologiques

1. 6. 1. Etude des caractères de la cellule végétative

Cette étude est effectuée sur des préparations microscopiques (entre lame et lamelle), à partir de cultures obtenues sur milieu liquide ou sur milieu solide. L'examen au microscope optique permet de distinguer la forme des cellules et leur mode de division.

1. 6. 2. Test de filamentation

L'aptitude à la filamentation est observée au microscope optique, à partir d'une culture obtenue sur milieu PDA. Ce milieu est fondu, puis déposé à l'aide d'une pipette sur une lame préalablement stérilisée dans une boîte de Pétri. Quand le milieu est solidifié, la culture à examiner est ensemencée en stries. L'incubation se fait à 22°C, pendant six jours.

Après incubation, les cultures sont examinées au microscope au faible grossissement (G X 400). Cet examen microscopique permet de rechercher la présence éventuelle d'un pseudomycélium ou d'un vrai mycélium.

1. 7. Etude des caractéristiques sexuelles

1. 7. 1. Test de la sporulation

La forme des asques, le nombre et la disposition des ascospores sont les caractères utilisés dans l'identification des levures. Les cellules sont cultivées sur un milieu de présporulation riche en glucose pendant 24 à 48 h, puis transférées aseptiquement sur les milieux de sporulation relativement pauvres en éléments nutritifs. Sachant que toutes les levures n'ont pas les mêmes exigences nutritionnelles, plusieurs milieux de sporulation sont utilisés. Le milieu Fowell, le milieu Mc Clary, le milieu Gorodkova et la gélose à l'extrait de Malt.

Ces milieux sont répartis aseptiquement dans des tubes inclinés, puis ensemencés et incubés à 28°C, pendant une à deux semaines. Des observations se font sur des préparations microscopiques au fort grossissement (G X 1000) pour examiner la forme de l'asque ainsi que le nombre et la forme des ascospores dans l'asque.

1. 7. 2. Observation microscopique des ascospores

Une anse de culture est répartie dans une goutte d'eau sur une lame, puis fixée à la chaleur. La préparation est plongée dans une solution de vert de malachite à 5 %, puis maintenue dans l'étuve à une température de 70°C pendant 1 minute.

Après séchage, la lame est retirée et l'excès de colorant est lavé à l'eau courante. Le lavage est suivi d'une coloration à la sapharanine ou la fuschine à 0.5 %. On laisse la réaction se faire pendant 30 minutes. Juste après, on procède à un séchage. La préparation est examinée au microscope optique avec le fort grossissement (G X 1000). Les ascospores apparaissent colorés en bleu vert et les cellules végétatives en rouge.

1. 8. Etude des caractéristiques physiologiques

Les principaux critères étudiés reposent sur la fermentation des composés sucrés et sur l'assimilation des composés carbonés et azotés.

1. 8. 1. Test de fermentation des sucres

Pour l'étude de la fermentation des sucres, nous avons utilisé le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, le melibiose, le tréhalose et le cellobiose. Ces sucres sont conditionnés dans des ampoules stériles à une concentration de 20%.

Le test de fermentation est effectué dans des tubes munis de cloches de Durham, contenant le milieu Wickerham. Ces tubes reçoivent la solution de sucre à tester, de façon à obtenir une concentration de 2 %. Ils sont, ensuite,ensemencés par la souche de levure à tester.

L'incubation se fait à 28°C, pendant quatre jours. La lecture des tubes se fait par la recherche de la présence ou l'absence de gaz dans la cloche comparés à des témoins.

1. 8. 2. Test d'assimilation des substrats carbonés

Ce test permet de déterminer la nature des substrats utilisés par la levure comme source d'énergie et de carbone, l'étude de l'assimilation des sucres, est réalisée avec le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose, le melibiose, le tréhalose, l'arabinose, le xylose, le cellobiose et l'inositol.

Ces sucres sont conditionnés dans des ampoules stériles, à une concentration de 20%. Le milieu auxanogramme solide dépourvu de source de carbone est utilisé pour le test de l'assimilation. Il estensemencé avec la souche de levure à tester et des disques en papier Wathman imprégnés avec la solution du sucre sont déposés à la surface de la gélose. Après 48 heures d'incubation à 30°C, il y a soit présence, soit absence de croissance autour du disque.

1. 8. 3. Test d'assimilation des nitrates

Ce test permet de déterminer la capacité de la levure à assimiler les nitrates. Le milieu utilisé est contenu dans des tubes à essai à raison de 10 ml. les tubes sontensemencés par une suspension de levure à tester et incubée à 28°C pendant trois jours.

Pour la lecture des résultats, chaque tube est additionné de deux gouttes de solution de nitrate réductase I et II. Lorsque, les nitrates sont assimilés, la couleur du milieu vire au rose rouge. Dans le cas contraire, on ajoute au même milieu de la poudre de zinc.

Si la couleur vire au rose, cela veut dire que les nitrates ne sont pas assimilés par la levure à tester. Par contre, si la couleur du milieu reste inchangée, cela implique que les nitrates sont bien utilisés par la levure testée.

1. 8. 4. Test d'osmophilie

La résistance aux fortes pressions osmotiques est mise en évidence sur un milieu liquide contenant 50% de glucose. Ce milieu est réparti en tubes à raison de 9 ml par tube. Après ensemencement, les tubes sont incubés pendant deux jours à 28°C.

La résistance à la pression osmotique se traduit par l'apparition d'un trouble dans le tube. Des observations au microscope optique (G X 400) des frottis prélevés (à partir du tube présentant le trouble) sont réalisés simultanément.

1. 8. 5. Test d'hydrolyse de l'urée

Pour le test de l'hydrolyse de l'urée, nous avons utilisé le milieu Christensen contenant un indicateur coloré. Ce milieu est réparti à raison de 4,5 ml par tube et 1 ml d'une solution d'urée à 20% est ajoutée dans chaque tube.

Les milieux sont ensuite ensemencés avec la souche de levure à tester, puis, incubés à 28°C pendant 5 jours. Les cultures sont observées quotidiennement. L'hydrolyse de l'urée se traduit par le virage du milieu au rouge rose due à une alcalinisation de ce dernier.

1. 8. 6. Test d'hydrolyse de la gélatine

Pour le test d'hydrolyse de la gélatine, nous avons utilisé le milieu Malt- exact- gélatine. Ce milieu est conditionné en tubes. L'ensemencement se fait par injection de la suspension de levure à tester au centre du milieu de culture et l'incubation se fait à 28°C pendant une semaine.

Pour examiner les cultures, les tubes à essai sont placés 1 heure au réfrigérateur à +4°C. La présence d'une liquéfaction du milieu de culture à cette température indique qu'il y a une hydrolyse de la gélatine.

1. 8. 7. Test de résistance à l'actidione

Pour cela, nous utilisons la gélose Sabouraud additionnée d'actidione réparti en tubes. La souche de levure à tester est ensemencée en stries, ensuite incubés à 28°C pendant 2 jours. La résistance à l'antibiotique se traduit par une croissance dans la tube.

2. Etude de la cinétique croissance des levures isolées et sélection de levures performantes en vue de la production de P.O.U

2. 1. Matériel biologique

Les souches de levures sont celles déjà isolées et identifiées précédemment

2. 2. Milieux utilisés

2. 2. 1. Milieu synthétique

Dans un premier temps, le milieu choisi pour la préculture et la culture des levures est le milieu Y.P.S.L (Yeast Pepton Sugar Lactose). Il permet un bon développement des souches de levures. Ce milieu contient comme source de carbone, le lactose à raison de 2%, de l'extrait de levure à 0,1% et de la peptone à 2 % (Janssens et al., -1984).

2. 2. 2. Milieu de culture à base de lactosérum

2. 2. 2. 1. Origine du lactosérum

C'est un lactosérum doux, de pH 5.25, d'acidité égale à 5°D et provenant de la laiterie O. R. L. A. C de Boudouaou -Boumerdès. Cette unité produit 6000 litres de lactosérum par jour. Il est issu de la fabrication du fromage à pâte pressée non cuite de type E. D. A. M. Le processus de fabrication du fromage est donné dans la Figure 9.

2. 2. 2. 2. Déprotéinisation du lactosérum

La déprotéinisation du lactosérum est indispensable pour trois raisons:

- Les levures n'assimilent pas la matière protéique,
- lorsque la concentration de la biomasse devient trop importante dans le fermenteur, les micelles de protéines provoquent la floculation de la culture,
- si les protéines ne sont pas séparées, elles seront perdues lors de la centrifugation du moût de fermentation.

Pour cela, le lactosérum subit un chauffage à 100°C en ramenant son pH à 4,6. Les protéines du lait précipitent par thermocoagulation. Après trois chauffages successifs à 100°C, pendant 30 minutes, une centrifugation à 3500 tr / mn est effectuée. Le surnageant est récupéré, filtré et enfin enrichi en facteurs nutritionnels.

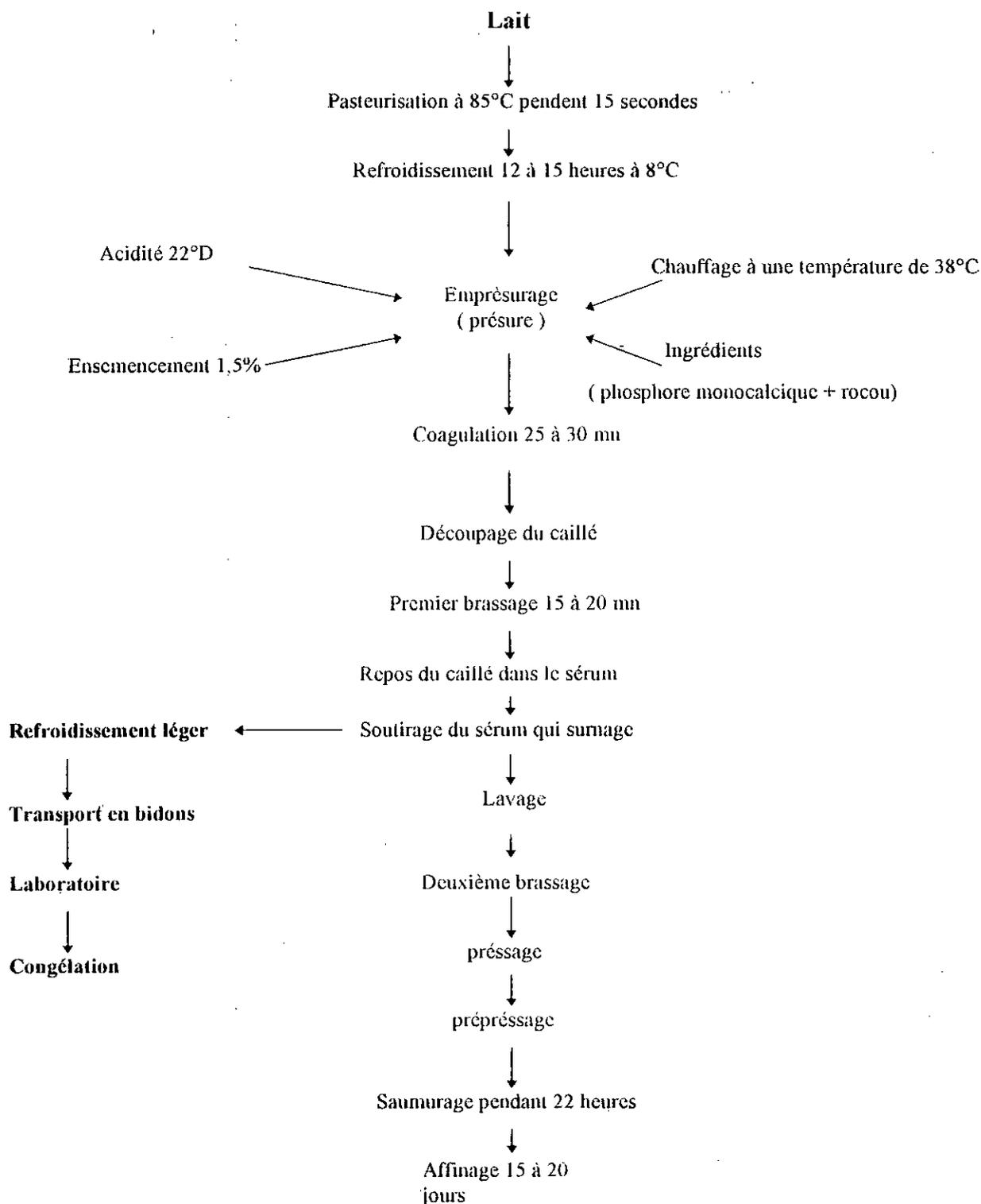


Fig. 9: Lactosérum issu de la fabrication du fromage à pâte pressée non cuite, type EDAM adapté à l'unité BOUDOUAOU et son transport jusqu'au laboratoire.

2. 2. 2. 3. Enrichissement en facteurs nutritionnels

Les fermentations sont conduites en discontinu et continu. Le milieu utilisé est un filtrat de lactosérum doux, auquel on ajoute des facteurs nutritionnels.

La concentration en lactose dans le lactosérum est ajustée à 20 g/l et additionné de 3 g/l de sulfate d'ammonium (Shay et Wegner -1985, Willetts et Ugalde -1987 et Kallel et al., -1991). Les facteurs de croissance (acides aminés et vitamines) sont ajoutés sous forme d'extrait de levure à raison de 1 g/l (Bayer -1983, Kallel et al., -1991).

Une solution d'oligo-éléments est ajoutée au milieu à raison de 1ml / litre de milieu. La composition en g/l de cette solution est la suivante (Kallel et al., 1991).

$CuSO_4$	0,3
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0,8
$NaMoO_2 \cdot 2H_2O$	0,4
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3,0
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	4,0

Le milieu est réparti dans des flacons stérilisables et autoclavés à 121°C pendant 15 minutes.

2. 3. Techniques analytiques

2. 3. 1. Détermination de la biomasse

La biomasse est évaluée en centrifugeant 10 ml de la culture à 3200 tr / mn, pendant 15 minutes. Après un lavage à l'eau distillée, le culot est récupéré dans une capsule en acier inoxydable préalablement tarée. La capsule est séchée à 105°C, pendant 24 heures, mise au dessiccateur puis pesée jusqu'à un poids constant. Le surnageant est récupéré pour le dosage des sucres résiduels.

2. 3. 2. Dosage des sucres résiduels

Les sucres résiduels du milieu de culture sont dosés par la méthode colorimétrique au phénolsulfurique (Dubois et al., 1956). Un volume du surnageant est dilué de telle façon à avoir une concentration de 0.1 à 0.8g /l.

Un millilitre de cette solution est mélangé avec 5ml d'une solution de phénol à 5% et 8 ml d'acide sulfurique concentré. Après dix minutes de réaction, les tubes sont mis au bain marie chauffant et maintenu à 20°C, pendant 30 minutes.

La densité optique est mesurée grâce à un spectrophotomètre (UV/Vis de type Perkin /Elmer) à une longueur d'onde de 488 nm. On détermine la concentration en sucres résiduels graphiquement grâce à sur une courbe étalon préalablement établie (Fig.10).

2. 3. 3. Dosage de l'éthanol

L'éthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse (Chromotographe de type HEWETT Packard) équipé d'une colonne en nickel, de longueur de 1,80 m, remplie par une phase stationnaire de type Porapak Q80 (Isotherme) et chauffée à 130°C. Le gaz vecteur est de l'hélium injecté à un débit de 25 ml/min. La température de l'injecteur est de 150°C et celle du détecteur (type Thermal Conductivity Detector) est de 200°C. L'éthanol pure est utilisé comme étalon interne.

2. 3. 4. Dosage de la matière protéique des levures

Pour le dosage des protéines, nous avons utilisé la méthode Kjeldahl. Elle consiste en la minéralisation des composés organiques en milieu acide et en présence d'un catalyseur. L'azote ammoniacal obtenu est dosé par titrimétrie après distillation en milieu alcalin. La teneur en protéines totales de la levure est déterminée par rapport à 100 grammes de matière sèche et en multipliant le taux d'azote par le coefficient 6,25.

2. 3. 5. Détermination de la demande chimique en oxygène (D.C.O)

Le dosage de la DCO consiste en la mesure de l'oxygène (mg/l) équivalent à la quantité de matières organiques oxydables par le dichromate de potassium, selon la méthode ISO 6060 (INAPI -1993).

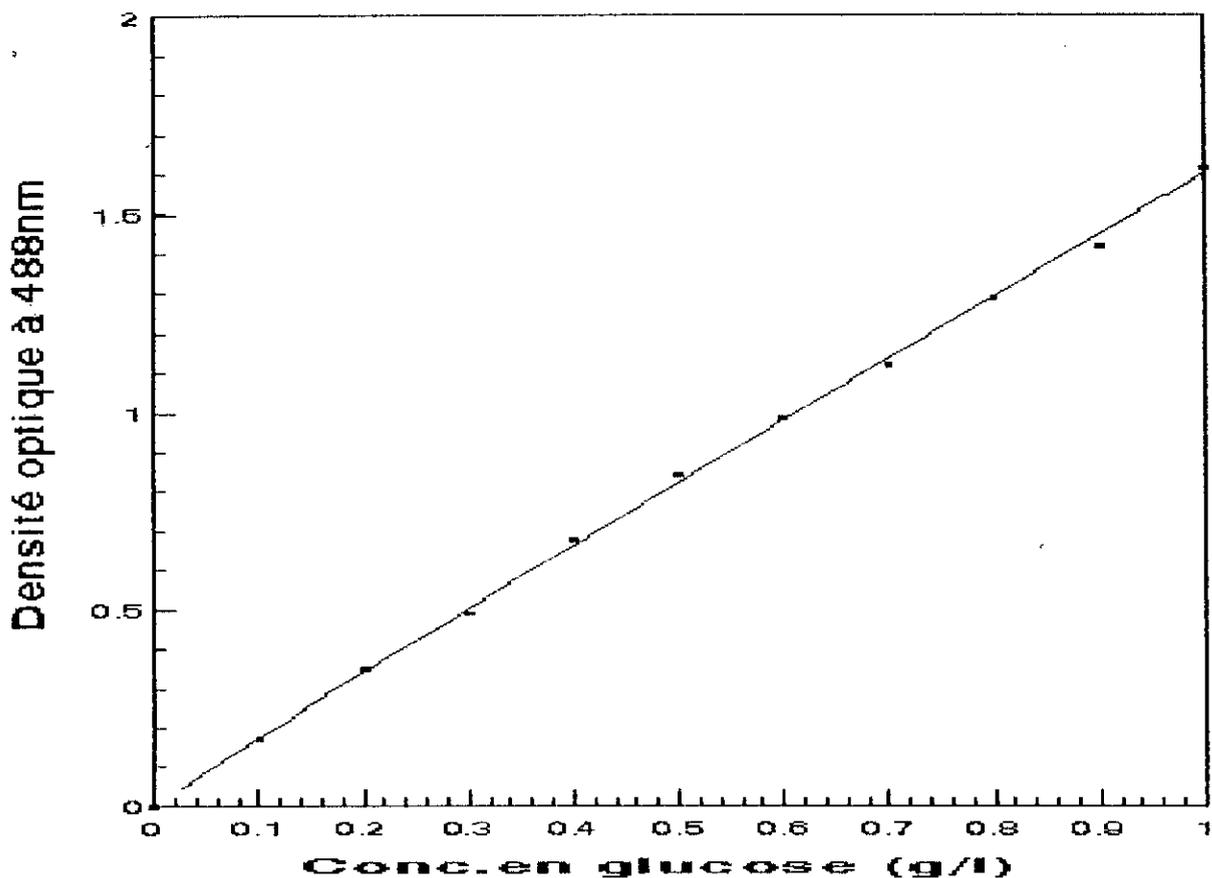
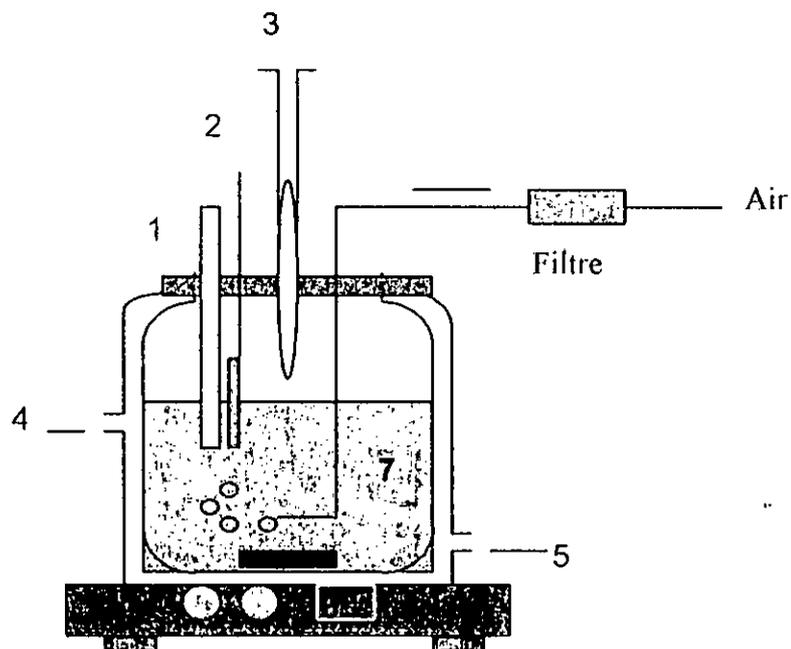


Fig 10: Courbe étalon du dosage des sucres à 488 nm.

2. 4. Bioréacteurs utilisés

2. 4. 1. Le minifermenteur

Pour les études préliminaires de la croissance des levures performantes, nous avons conçu un minifermenteur de 200 ml dont le dispositif est représenté sur la Figure 11.



(1): Thermomètre, (2): Sonde de pH-mètre, (3): Burette de soude, (4), (5): Entrée et sortie d'eau de refroidissement, (6): Agitateur avec plaque chauffante, (7): Milieu de culture.

Fig. 11: Dispositif de fermentation

Une agitation de 700 tr/min et un chauffage de 30 °C sont assurés par une plaque d'agitation chauffante de type IKMAG. L'aération est assurée par une pompe à air de type RENA -101. Le pH étant maintenu à 5.

2. 4. 2. Le bioréacteur de 2 litres

La production de biomasse est réalisée dans un bioréacteur de type SET 002 M d'une capacité totale de 2000 ml. Ce fermenteur est composé:

- D'une cuve en verre de 2 litres,
- d'une platine supérieure,
- d'un module électronique permettant de contrôler toutes les fonctions du réacteur,
- d'une baffle chauffante TP/02 (M/B/220V) d'une puissance de 100 W ,
- la température est réglée grâce à un régulateur balayant une gamme de 0-150°C,
- le pH du milieu est contrôlé par un système de régulation automatique contrôlant une pompe péristaltique, modèle 30/ PPV. 7F/ munie d'une sonde à pH,

- l'aération du bioréacteur, muni d'un diffuseur d'air fixe, modèle SPARGER est assurée par un compresseur à air relié au support qui est munie d'un débitmètre (0 - 250 l/h),
- l'oxygène dissous est détecté dans le milieu de culture grâce à une sonde à oxygène de type INGOLD reliée à un oxymètre (Microprocesseur oxymètre 2000), muni d'un afficheur de valeurs mesurées en ppm d'O₂ ou en % de la saturation.

2. 4. 3. Le bioréacteur de 5 litres

Nous avons utilisé un système de fermentation de type HEUSER/ BLR composé:

- d'une cuve en verre d'une capacité de 5 litres munie d'une platine supérieure sur laquelle est déposé le moteur d'agitation DC (50 à 1000rpm) à module digital,
- d'un système de données avec ordinateur et logiciel,
- d'un système de régulation de température PID à enveloppe chauffante silicone et une sonde PT100,
- d'un régulateur de pH avec étalonnage sur deux points avec une pompe péristaltique et une électrode à pH,
- d'un système antimousse avec sonde et une pompe péristaltique,
- d'un système d'aération comprenant le compresseur et une vanne de régulation du flux gazeux muni d'un filtre à air (entrée/sortie) et d'un diffuseur SPARGER,
- La mesure de l'oxygène dissous se fait par une sonde à oxygène de type INGOLD .

2. 5. Stérilisation des bioréacteurs

Nous donnerons à titre d'exemple la procédure employée pour la stérilisation du minifermuteur. Le minifermuteur est rempli avec 100 ml de milieu de culture.

Les accessoires employés sont reliés au minifermuteur par les différents montages, (la burette de soude, le filtre à air et le thermomètre), la soude 2 N est remplie dans un flacon de 250 ml.

Le minifermuteur (connecté aux différents éléments) contenant le milieu et le barreau magnétique; le flacon de soude sont autoclavés à 121°C pendant 15 mn.

L'électrode de verre est stérilisée séparément juste avant le lancement de la fermentation par lavage répétée à l'eau bouillante. La procédure employée pour les deux autres types de fermenteurs (2 et 5l) est très proche de celle décrite ci-dessus.

2. 6. Conduite des fermentations

2. 6. 1. Préparation de l'inoculum

Les précultures sont conduites dans des fioles d'erlenmeyers d'une capacité de 500 ml et contenant 50 ml de milieu de culture. Ce milieu estensemencé avec une anse de culture jeune de levure à étudier (obtenue sur milieu Sabouraud). Les précultures sont incubées à 30°C sous agitation magnétique, pendant 16 heures. Ces précultures serviront d'inoculum pour les essais de fermentation en discontinue et continue.

2. 6. 2. Conduite de la fermentation discontinue

2. 6. 2. 1. En minifermuteur

Après vérification de la pureté de la préculture, par une observation au microscope optique 10 ml de la préculture sont introduits stérilement dans 100 ml de milieu de culture stérile et frais. La biomasse introduite a une densité optique (DO) égale à 2.

L'inoculation du minifermuteur se fait par simple transfert du volume de la préculture dans du milieu frais. La préculture destinée à l'inoculation des fermenteurs est centrifugée et le culot de levures, repris dans un volume minimum de milieu de culture. L'inoculum correspond à une biomasse de 1,5g/l.

2. 6. 2. 2. En bioréacteur de 2 litres

Les cultures discontinues sont conduites dans un fermenteur de deux litres(fig.12). Le volume utile est de 1,2 litres, correspondant au volume du milieu à utiliser. Le pH est ajusté à 4,50 avec du NaOH 2N .Les conditions opératoires de la fermentation sont les suivantes:

- *Température:* 30°C
- *pH:* 4,50
- *Agitation:* 720 tr/ min
- *Aération:* 1,30 vvm

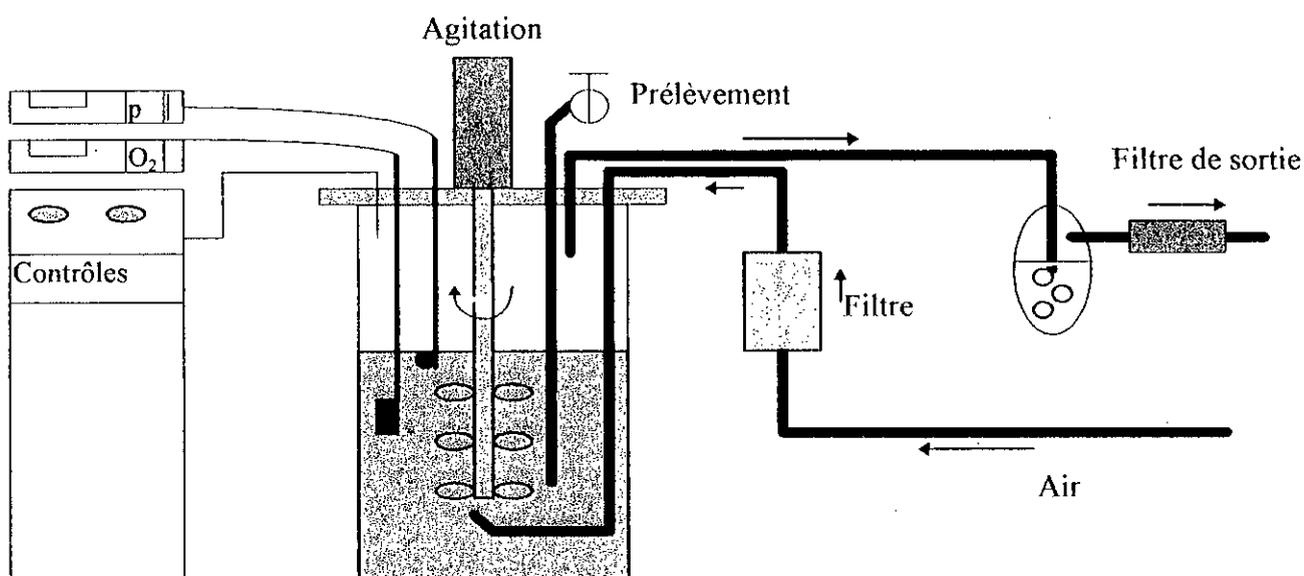


Fig.12: Schéma de principe d'une culture discontinue

La formation de mousse est contrôlée par l'ajout synchronisé d'antimousse chimique (polyéthylène glycol). Le suivi de la croissance se fait par la mesure de la densité optique à 600 nm du moût de la fermentation. Au cours de la croissance, nous procéderont au dosage du lactose résiduel et des métabolites éventuellement formés, telque l'éthanol.

2. 6. 2. 3. En bioréacteur de 5 litres

En réacteur de 5 litres, nous avons utilisé un volume utile de 3 litres. La température est maintenue à 30 °C, le pH est régulé à 4,5 avec addition de NaOH 2N. La formation de la mousse est contrôlée par l'ajout d'antimousse. L'agitation est réglée à 700 tr/ mn et l'aération est assurée par un débitmètre de 1.6 vvm

2. 6. 3. Conduite de la fermentation continue

2. 6. 3. 1. Culture en fermenteur de 2 litres

Cette fermentation est mise en œuvre juste avant la fin de la culture discontinue dès que la concentration en substrat devient facteur limitant. Le schéma de principe de cette fermentation est montré sur la Figure 13.

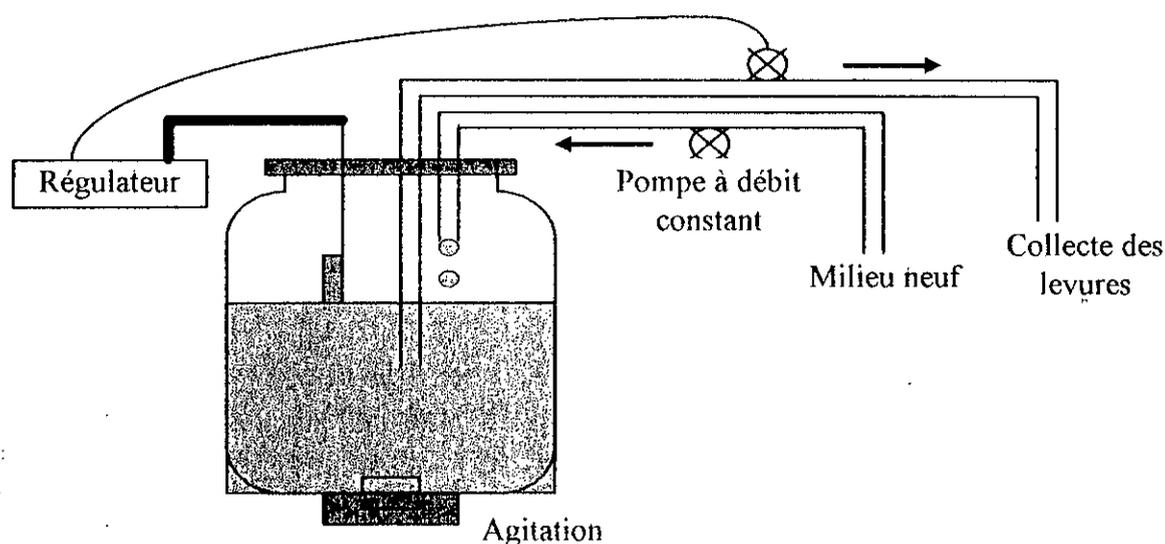


Fig. 13: Schéma de principe d'une culture continue.

L'alimentation du fermenteur en milieu frais est réalisée de façon aseptique grâce à une pompe péristaltique munie d'un débitmètre.

Le soutirage du moût se fait avec le même débit d'entrée du milieu neuf. Ainsi, on maintient le même volume dans le fermenteur. Les conditions de la fermentation sont les mêmes que celles utilisées dans le cas de la fermentation en discontinue.

2. 6. 4. Détermination de K_{La}

La mesure du K_{La} d'un bioréacteur permet d'évaluer ses capacités à transférer l'oxygène dans des conditions d'aération et d'agitation bien définies. Il existe plusieurs méthodes pour mesurer le K_{La} .

Parmi ces méthodes, la méthode au sulfites (Cooper et al.,-1944), la méthode dynamique (Atiskon et Mavituna -1983) et la méthode statique (Corrieu et al., -1975) sont les plus utilisées. Ces méthodes sont conduites dans un milieu exempt de cellules et permettent de déterminer la valeur de K_{La} dans des conditions où se déroulera la fermentation.

Après avoir saturé le milieu de culture en oxygène dissous, l'aération est arrêtée et l'azote est ajouté dans le milieu. La concentration en oxygène dissous mesurée par l'oxymètre tend à diminuer vers zéro. On reprend, alors, l'injection d'air dans les conditions de débit à tester (Fig 14).

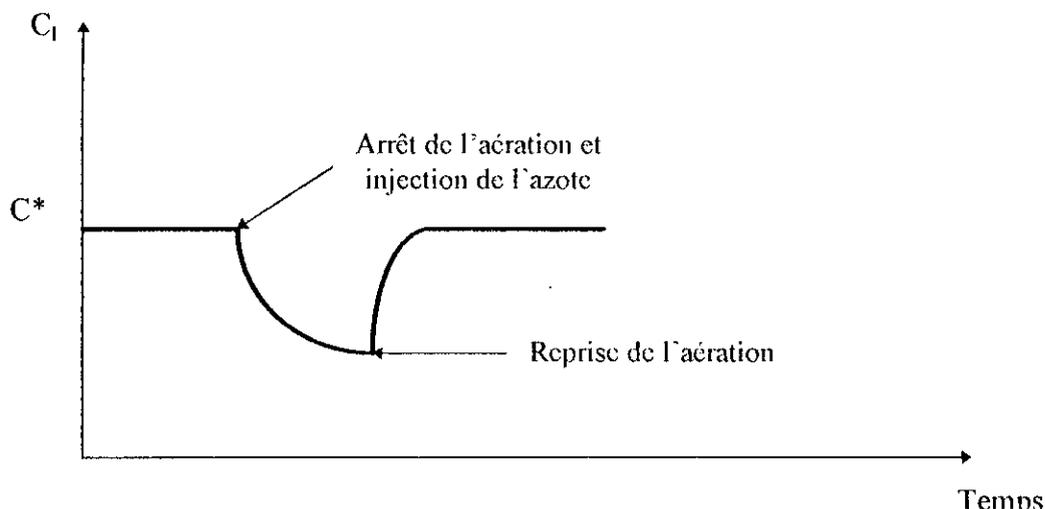


Fig. 14: Variation de la concentration de l'oxygène dissous dans un milieu saturé en oxygène en fonction du temps.

Les variations de la concentration en oxygène dissous se traduisent par l'équation suivante:

$$dC_1 / dt = f (C^* - C_1) \quad (1)$$

avec:

C^* = concentration en oxygène dissous en équilibre avec la fraction partielle dans la phase gazeuse. Elle est égale à la concentration saturante dans le milieu exprimée en mg/l ou en ppm ou en mmole d' O_2 / l.

C_1 = concentration en oxygène dans la phase liquide exprimée en mg / l ou ppm ou mM d' O_2 / l. La pente de la droite est égale à $K_{L,a}$. On procède par l'intégration de l'équation de transfert suivante:

$$\frac{dC}{dt} = K_{L,a} \cdot (C^* - C_1) \quad (2)$$

à $t = 0$, quand, on reprend l'aération, $C_1 = 0$, d'où l'équation ci-dessus devient:

$$\log \frac{C^*}{C^* - C_1} = C^* - C_1 \quad (3)$$

A partir de la courbe $C_1 = f (t)$, les variations du $\log \frac{C^*}{C^* - C_1}$ en fonction du temps. La droite obtenue a pour pente $K_{L,a}$ (exprimée en h^{-1}).

2. 6. 5. Rappel sur les principaux paramètres de la croissance microbienne

L'étude consiste à suivre, en fonction du temps, l'évolution de la concentration cellulaire (Fig. 15). Dans un milieu de culture non renouvelé et dans des conditions de température et de pH déterminés, la croissance d'un micro-organisme passe par quatre grandes phases distinctes. L'activité microbienne est évaluée graphiquement et elle quantifie la concentration cellulaire X et/ou son logarithme en fonction du temps. Les quatre grandes phases de croissance sont les suivantes:

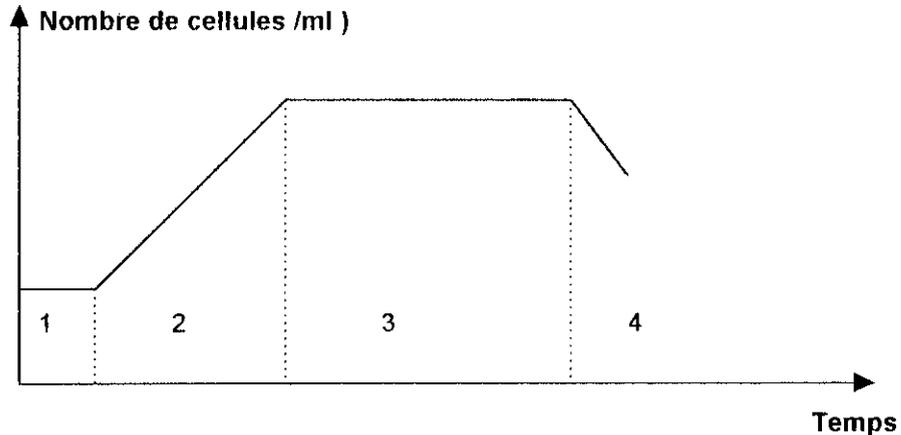


Fig. 15: Courbe de croissance microbienne (Scriban -1993)

(1): phase de latence, (2): phase de croissance, (3): phase stationnaire, (4): phase de déclin

i). Phase de latence

Elle commence immédiatement après l'ensemencement du micro-organisme, dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation du micro-organisme au milieu. Au cours de cette période, la cellule synthétise les enzymes nécessaires pour métaboliser le substrat présent. Durant cette phase, il n'y a pas de multiplication cellulaire.

$$X = C^{te} = X_0 \quad (4)$$

X_0 étant la concentration cellulaire au temps $t = 0$.

ii). Phase d'accélération

Après l'adaptation du micro-organisme, cette phase correspond au commencement de la multiplication cellulaire. La concentration cellulaire X et la vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance μ augmentent, suite au début de la reproduction cellulaire.

iii). Phase de croissance

Quand la vitesse de reproduction cellulaire atteint son maximum, on assiste à une phase exponentielle de croissance. Elle dure tant que la vitesse de reproduction dX/dt est constante. En coordonnées semi-logarithmique, une droite $\log X = f^c(t)$ est obtenue:

$$dX/dt \cdot 1/X = \mu_{max} \quad (5)$$

iv). Phase de ralentissement

A un moment donné, la courbe de croissance tracée en coordonnées ordinaires présente un point d'inflexion. En biochimie, cette inflexion correspond à l'épuisement du milieu de culture. Il y a, alors, disparition d'un ou de plusieurs composés nécessaires à la croissance. La concentration X continue d'augmenter, alors que les rapports dX/dt et $dX/dt \cdot 1/X$ diminuent.

v). Phase stationnaire

La concentration cellulaire X atteint son maximum et la croissance s'arrête. Les cellules conservent une activité métabolique et leur structure biochimique subit des modifications

vi). Phase de décroissance

Le nombre de cellules viables diminue du fait de la mortalité. Le taux de croissance décroît progressivement et parallèlement la concentration en biomasse diminue par suite de l'autolyse.

2. 6. 5. 1. Equations utilisées en fermentation discontinue

La fermentation discontinue peut être considérée comme étant un système fermé à $t = 0$. La solution nutritive stérilisée introduite dans le fermenteur estensemencée avec l'inoculum à étudier.

L'incubation se fait dans des conditions choisies de température, d'agitation et de pH. Les principaux paramètres qui gèrent la culture microbienne en discontinue sont les suivants:

- X, S et P correspondant aux concentrations massiques en biomasse (X), en substrat (S) et en produit (P), exprimés en (g/l).
- r_x , r_s et r_p correspondant aux vitesses de production de la biomasse (r_x), d'utilisation du substrat (r_s) et de la formation du produit (r_p) exprimées en (g/l.h).

On définit, ainsi:

$\mu (h^{-1}) = \frac{r_x}{x} = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} =$ vitesse spécifique de croissance microbienne (g de biomasse formée / g de biomasse présente).

$q_s (h^{-1}) = \frac{r_s}{x} = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{X} =$ vitesse spécifique d'utilisation du substrat (gramme de substrat utilisé / gramme de substrat présent).

2. 6. 5. 2. Calcul de rendement en biomasse

i - Calcul de rendement global

$$R_x = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (6)$$

avec S = substrat résiduel.

ii - Calcul de rendement instantané

$$R_x = \frac{r_x}{r_s} \quad (7),$$

iii - Relation entre le μ et S

La variation du taux de croissance μ en fonction de la concentration en substrat S (équation 8) peuvent être traduites par différents modèles dont celui de Monod qui se base sur la cinétique de Michaelis -Menten (Fig. 16).

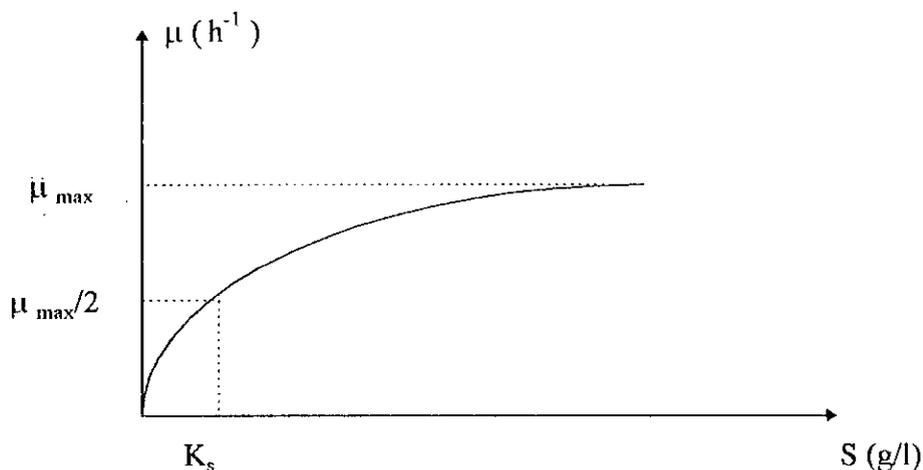


Fig 16: Variation du tau x de croissance μ en fonction de la concentration en substrat S.

$$\text{avec } \mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (8)$$

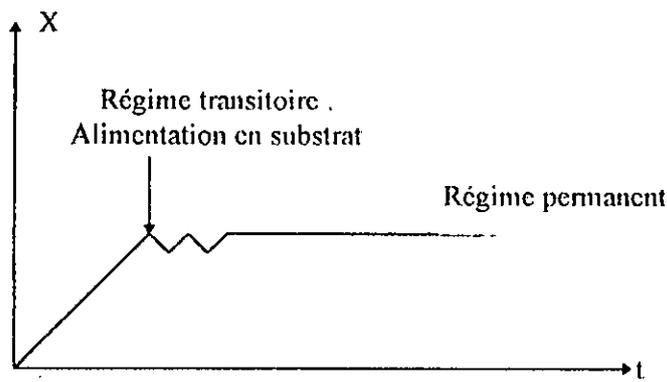
μ_{\max} = Taux de croissance maximum (h^{-1}),

S = concentration en substrat (g/l) et K_s = constante de Michaelis -Menten (g/l).

2. 6. 5. 2. Equations utilisées en fermentation continue

Dans un système infiniment mélangé, en tout point du fermenteur X, S et P gardent la même concentration au cours du temps. Ceci implique que $dX/dt = dP/dt = dS/dt = 0$.

D'après la Figure 17, il se forme un état d'équilibre. Le régime permanent s'établit, après trois générations. successives



**Fig. 17: Variation de la biomasse en fonction du temps
Etablissement du régime permanent**

La variation de la biomasse s'exprime par l'équation suivante:

$$dX / dt = \mu X - D X - K_d X \quad (9)$$

D: taux horaire ou taux de dilution (h^{-1}) = débit horaire (Q) / le volume utile du réacteur (V),

K_d : coefficient spécifique de lyse cellulaire (h^{-1}).

D'autre part la variation du substrat s'exprime comme suit:

$$dS / dt = D \cdot (S_0 - S) - Y_x^{-1} dX / dt - Y_p^{-1} \cdot dP / dt - m_x \quad (10)$$

Y_x^{-1} = taux de conservation limite en biomasse,

Y_p^{-1} = taux de conservation limite en métabolite,

m_x = coefficient de maintenance cellulaire (h^{-1}).

Quand, on atteint l'effet d'équilibre ou permanent, la constante K_d est égale à zéro. La concentration en biomasse et en substrat deviennent constantes et sont représentées par X et S.

i - Calcul du substrat à l'équilibre

En régime permanent, on a:

$$\mu = D = \mu_{\max} \cdot \frac{\mu_{\max} S}{S - K} \Rightarrow \tilde{S} = \frac{D \cdot K_s}{\mu_{\max} - D} \quad (11)$$

S: Concentration en substrat résiduel à l'état d'équilibre.

ii - Calcul de la biomasse à l'équilibre

$$\tilde{X} = R_x \cdot (S_0 - \tilde{S}) \quad (12)$$

$$R_x = \frac{\tilde{X} - X_0}{S_0 - \tilde{S}} \quad (13)$$

Quand X_0 tend vers zéro, on obtient la productivité (g / l . h) donnée par:

$$P = D \cdot \check{X} \quad (14)$$

iii - Calcul du taux de dilution optimal

La productivité DX passe par un optimum dépendant de S_0 , K_s et μ_{\max} qui caractérise le taux de dilution optimum (D_{opt}):

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}}\right) \quad (15)$$

iv - Calcul du taux de dilution critique D_c

Le taux de dilution critique est atteint, quand S_0 tend vers zéro, selon:

$$D_c = \mu_{\max} \cdot \frac{S_0}{K_s + S_0} \quad (16)$$

Le taux de dilution critique est caractérisé par le lessivage de la culture.

v - Variation du rendement due à la maintenance cellulaire

Dans ces conditions, $r_s \cdot (dS / dt)$ comporte un terme supplémentaire du au substrat utilisé pour la maintenance cellulaire (Fig. 18). On obtient, alors:

$$dS / dt = Y_X^{-1} \cdot dX / dt + Y_P^{-1} \cdot dP / dt + mX \quad (17)$$

$$r_s = Y_X^{-1} \cdot r_X + Y_P^{-1} \cdot r_P + mX \quad (18)$$

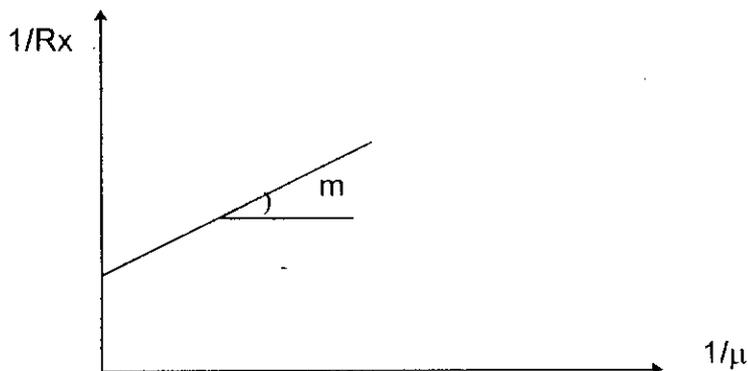


Fig. 18: Dédution graphique de la constante de maintenance.

En absence de production de métabolites, on a:

$$r_s = Y_X^{-1} \cdot r_X + mX \quad (19)$$

$$r_s = 1/Y_X \cdot r_X + mx$$

Sachant que: $r_s = r_{SX} + r_{Sm}$

$r_{Sm} = mX$ et $r_X = \mu.X$ on aura: $R_x = r_x / r_s$ égale à $R_x = \frac{\mu X}{r_{SX} + r_{Sm}} = \frac{\mu}{\frac{\mu}{Y_X} + m}$

d'où: $\frac{1}{R_x} = \frac{1}{Y_X} + \frac{m}{\mu}$. (20)

On peut déduire graphiquement la maintenance, selon le graphe de la Figure 18.

CHAPITRE III
RESULTATS & DISCUSSIONS

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Isolement et identification des levures locales en vue de la production de P.O.U

Notre étude a porté sur l'identification de 10 souches de levures isolées à partir de 5 échantillons de produits laitiers différents, le fromage à pâte molle et cuite, le yaourt, le lait de vache cru, le lait pasteurisé et le lactosérum doux.

Nous avons caractérisé ces levures; en se basant sur des méthodes conventionnelles établies par **Lodder (1971)**, **Barnett et Pankhurst (1974)** et **Barnett et al., (1979)**. Ces méthodes reposent sur la détermination des divers caractères morphologiques et physiologiques des levures.

Les méthodes rapides actuelles (**API 50 CH**) peuvent dans certains cas se substituer valablement à la démarche classique d'identification. Par exemple pour les levures rencontrées en milieu hospitalier. En revanche, elles s'avèrent inadaptées aux espèces isolées des produits laitiers et alimentaires (**Schmidt et Lenoir -1980**).

Les critères morphologiques comportent l'aspect de la cellule, l'aptitude à la filamentation et à la sporulation, l'apparence de la culture en milieu liquide et sur milieu solide.

Parmi; les critères physiologiques figurent l'assimilation d'un composé azoté (le nitrate de potassium), l'assimilation et la fermentation des différentes sources de carbone et la résistance à certaines conditions défavorables du milieu (présence d'antibiotique ou de forte concentration en sucre).

Selon les données de **Barnett et al. (1979)** et **Lodder (1971)**, 439 espèces de levures appartenant à 57 genres différents ont été recensées et identifiées par ces méthodes.

1. 1. Caractérisation du groupe de levures se divisant par scissiparité

Dans les clés dichotomiques simplifiées de la classification des levures, il est établi que la plupart des levures présentent deux modes de division asexuée (**Galzy et Guiraud., 1980, Bouix et Leveau -1980**).

Le premier groupe renferme les espèces du genre *Schizosaccharomyces* qui se divisent par scissiparité. Le deuxième groupe est composé par la plupart des autres levures qui se reproduisent végétativement par bourgeonnement.

Parmi les levures isolées, les souches VLV, FR1 et FR4 obtenues respectivement à partir du lait de vache, du fromage à pâte cuite et du fromage à pâte molle, ont une reproduction asexuée caractérisée par la scissiparité.

D'après certains auteurs et **Lodder (1971)** en particulier, seuls les *Schizosaccharomycoideae* sont caractérisés par un mode de division asexuée par scissiparité. Selon le même auteur, cette famille comporte un seul genre.

Il s'agit du genre *Schizosaccharomyces* et qui est représenté par 4 espèces: *S Japonicus*, *S pombe*, *S malidevorans* et *S. octosporus*. Les souches isolées FR1, FR4 et VLV présentent, globalement, les mêmes caractéristiques morphologiques et sexuelles du genre *Schizosaccharomyces*.

En effet, Galzy et Guiraud (1980), Lodder (1971) ainsi que plusieurs auteurs, caractérisent ce genre par des colonies de couleur crème blanchâtre sur milieu solide. Les cellules sont de forme allongée, ovoïde et sphérique. Elles filamentent pour donner un vrai mycelium qui se fragmente en arthrospores. La reproduction sexuée est présente et les spores sont de forme globulaires. Leur nombre varie entre 4 à 8 spores, selon les espèces. Les nitrates ne sont jamais assimilés par le genre *Schizosaccharomyces*. L'assimilation et la fermentation des divers composés sucrés varient d'une espèce à l'autre.

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques et sexuelles des espèces du genre *Schizosaccharomyces* sont résumées dans le Tableau 9. Les résultats morphologiques, sexuelles et les résultats d'assimilation et de fermentation des sucres des souches de levures FR1, FR4 et VLV sont présentés respectivement dans les tableaux 10, 11, 12, 13, 14 et 15.

En comparant nos résultats (Tableaux 10, 11, 12, 13, 14 et 15) à ceux consignés dans le Tableau 10, nous constatons que les souches de levures FR1, FR4 ont les mêmes caractéristiques que la souche *Schizosaccharomyces octosporus*. Cette dernière a été isolée par Lodder (1971), à partir des mélasses de canne à sucre.

Elle est très répandue dans les produits alimentaires sucrés, mais rarement dans les produits laitiers (Davenport-1980). La présence du genre *Schizosaccharomyces octosporus*, dans les fromages est expliquée par l'apport des spores de ce genre de levure par un ingrédient entrant dans la préparation du fromage.

Quand à la souche de levure VLV, elle présente les mêmes caractéristiques que l'espèce *Schizosaccharomyces malidevorans*. Et ceci par comparaison des résultats obtenus dans les tableaux 10, 11, 12, 13, 14 et 15 et les caractéristiques établis dans le Tableau 9. La présence de cette levure, dans un produit laitier tel que le lait de vache cru, n'a pas été démontré auparavant. Le biotope naturel de cette souche n'est pas connu (Lodder -1971).

**Tableau 9: Principales caractéristiques des espèces
du genre *Schizosaccharomyces* (Lodder -1971).**

<i>Les espèces du genre Schizosaccharomyces</i>		<i>S. japonicus</i>	<i>S. pombe</i>	<i>S. malidevorans</i>	<i>S. octosporus</i>
<i>Forme de ascospores</i>		Globulaire à ellipsoïde	Globulaire à ellipsoïde	Globulaire à ellipsoïde	Ellipsoïde
<i>Nombre d'ascospores</i>		6 à 8	4 à 6	4	6 à 8
<i>Forme des cellules végétatives</i>		Cellules sphériques à cylindriques	Cellules ellipsoïdales ou globulaires à cylindriques	Cellules arrondies	Globulaires à cylindriques
<i>Assimilation des nitrates</i>		-	-	-	-
<i>Croissance sur milieu contenant 50% de glucose</i>		-	+	+	+
<i>Aspect de la pigmentation dans le un milieu liquidé</i>		<i>présence de Sédiment fin</i>	<i>Absence de pellicule</i>		<i>Présence de sédiment</i>
<i>Aspect des colonies sur milieu de culture solide</i>		<i>Petites colonies de couleur crème</i>	<i>Colonies lisses</i>	<i>Colonies lisses et plates de couleur grise</i>	<i>Colonies irrégulières et grises</i>
	<i>Glycose</i>	+	+	+	+
	<i>Galactose</i>	-	-	-	-
	<i>Maltose</i>	+	+	-	+
<i>Fermentation des sucres</i>	<i>Lactose</i>	-	-	-	-
	<i>Melibiose</i>	+	-	-	-
	<i>Raffinose</i>	+	+	+	-
	<i>Saccharose</i>	+	+	+	+

Tableau 11: Résultats de l'observation microscopique de différentes souches isolées.

Souches isolées		VLI	VY1	VY2	LP1	FR1	FR2	FR3	FR4	VKL1	VLV
Critères											
Caractère de la cellule végétative		ronde à ovales	rondes à ovales	rondes à ovales	rondes à ovales	ovoïdes allongées sphériques	rondes à ovales	rondes à ovales	ovoïdes allongées sphériques	rondes à ovales	ronde cylindrique ovale
Aptitude à la filamentation	Pseudo-mycélium	présent	présent	présent	présent	absent	présent	présent	absent	présent	absent
filamentation	vrai mycélium	absent	absent	absent	absent	présent	absent	absent	présent	absent	présent

C'est une levure qui a été isolée pour la première fois à partir de raisins (**Davenport-1980**). Elle est caractérisée par son incapacité à assimiler le maltose. Mais, elle croit facilement sur le glucose.

Ainsi, parmi les dix souches de levures isolées, les souches FR4, FR1 et VLV appartiennent au genre *Schizosaccharomyces* et respectivement aux espèces *octosporus* et *maldevorans*. Ce groupe de levures n'est pas très répandu dans les produits laitiers (**Davenport-1980**).

Par ailleurs, **Phaff et al. (1978)** ont établi que lorsqu'une levure est rarement rencontrée, il est permis de supposer qu'elle n'est pas très répandue dans la nature ou qu'elle soit mal définie. De plus, il convient de rappeler que la plupart des levures présentent généralement une localisation géographique particulière.

1. 2. Caractérisation de groupe de levures se divisant par bourgeonnement

Parmi les 10 souches de levures isolées, il existe trois espèces de levures à posséder un mode de division par scissiparité. Parmi les souches restantes, aucune d'elles ne se divise par bourgeonnement bipolaire. Donc, elle ne peut pas correspondre à l'un des genres suivants: *Kloeckera*, *Wickerhramia*, *Nadsonia* et *Hanseniaspora* cités par **Kurtzman (1990)**.

Il est utile de noter que les souches isolées se reproduisent toutes végétativement par bourgeonnement multipolaire. De ce fait, les genres de levures cités au-dessus sont à exclure.

Selon **Lodder (1971)**, **Barnett et al. (1979)**, le critère de la sporulation est à la base de la dichotomie entre les levures ascosporegènes (ascomycètes et basidiomycètes) et anascosporegènes (fungi imperfecti). Ceci est possible, quand les épreuves physiologiques ne permettent pas à elles seules de distinguer ces grands types de levures.

En effet, certaines levures anascosporegènes présentent des caractères identiques à ceux des espèces ascosporegènes.

Ainsi, l'étude de l'aptitude à la sporulation permet de distinguer entre les souches de levures isolées, VL₁, VY₁, FR₂, FR₃, VKL₁ et les souches LP₁ et VY₂. Ces deux dernières n'ont aucune aptitude à former des ascospores.

Ainsi, les souches LP₁ et VY₂ - présentent des similitudes de caractères avec les genres *Candida*, *Torulopsis* et *Cryptococcus* décrits par **Lodder (1971)**.

Et afin de différencier le genre *Cryptococcus* du genre *Torulopsis*, **Lodder (1971)** propose d'inclure dans le genre *Cryptococcus* toutes les espèces assimilatrices de l'inositol comme seule et unique source de carbone. De plus, cet auteur considère également le test d'assimilation de l'inositol comme critère important dans la distinction entre le genre *Cryptococcus* et le genre *Torulopsis*.

En effet le genre *Cryptococcus* assimile seulement l'inositol et le genre *Torulopsis* est incapable d'assimiler ce composé carboné.

Tableau 12: Résultats du test de fermentation des sucres par les différentes souches de levures isolées.

Sucres \ Souches isolées	Souches isolées									
	VL1	VY1	VY2	LP1	FR1	FR2	FR3	FR4	VK.L1	VL.V
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Saccharose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Lactose	+++	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Tréhalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+++): Rapidement, (+): Positif, (-): Négatif.

Tableau 13: Résultats du test d'assimilation des composés carbonés et nitrates des différentes souches de levures isolées.

Composé carboné \ Souches isolées	Souches isolées									
	VL1	VY1	VY2	LP1	FR1	FR2	FR3	FR4	VK.L1	VL.V
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
Tréhalose	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
cellobiose	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
nitrate de potassium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	/	/	+	+	/	/	/	/	/	/

(+): Positif, (-): Négatif, (/) indéterminé

Or en comparant nos résultats (Tableaux 12 et 13) aux caractéristiques des genres *Cryptococcus* et *Torulopsis*, nous remarquons que les souches LP₁ et VY₂ assimilent l'inositol ainsi que d'autres sources de carbone.

En outre, (Davenport (1980) propose en parallèle une solution pour différencier entre les genres *Torulopsis* et *Cryptococcus*. La fermentation constitue un critère taxonomique acceptable, grâce auquel les espèces fermentaires peuvent être liées au genre *Torulopsis*. Les espèces qui ne fermentent aucune source de carbone appartiennent au genre *Cryptococcus*.

Cependant, Lodder (1971) décrit plusieurs espèces du genre *Torulopsis* ne fermentant pas le glucose. Mais d'après les résultats obtenus (Tableaux 12 et 13), les souches LP₁ et VY₂ fermentent facilement le glucose. Donc, les levures LP1 et VY2 n'appartiennent ni au genre *Torulopsis* ni au genre *Cryptococcus*.

Quand aux genres *Candida* et *Torulopsis*, il est souvent difficile de les distinguer puisqu'ils présentent beaucoup de caractères communs. Pour cela, Lodder (1971) adopte le test de filamentation ou de la formation du pseudomycélium comme caractère distinctif.

En effet, la plupart des espèces du genre *Candida* sont caractérisées par leur aptitude à former un pseudomycélium bien développé. Alors qu'il est absent ou rudimentaire chez le genre *Torulopsis*. Or, les souches de levures LP1 et VY2 forment un pseudomycélium abondant.

Au regard de cette gamme de critères distinctifs, nous avons pu identifier les souches LP₁ et VY₂ et les rattacher au genre *Candida*. D'après Lodder (1971) et Kurtzman (1990), le genre *Candida* est représenté par 73 espèces. Parmi lesquelles, on trouve *C. kefyr* et *C. pseudotropicalis*.

Le genre *Candida* est défini par les caractères suivants: les cellules sont globulaires, ovoïdes, cylindriques ou allongées mais jamais ogivales. Elles se divisent par bourgeonnement. Les cellules filamentent pour donner un pseudomycélium abondant (Lodder -1971, Galzy et Guiraud -1980, Bourgeois et Leveau 1980, Kurtzman -1990).

Ainsi, définies par ces auteurs, *C. kefyr* et *C. pseudotropicalis* présentent les mêmes caractères que les souches de levures isolées LP₁ et VY₂. La distinction entre les deux premières réside dans leur aptitude à assimiler le xylose, un sucre facilement utilisé par *C. pseudotropicalis*.

D'après les tests d'assimilation et de fermentation des composés carbonés obtenus et représentés dans les tableaux 12 et 13, les souches LP₁ et VY₂ isolées respectivement du lait pasteurisé et du yaourt sont rattachées au genre *Candida* et à l'espèce *kefyr*.

D'après Barnett et al., (1979) et Schmidt et Baroiller (1984), *C. kefyr* est la forme imparfaite et anascosporogènes de *Kluyveromyces marxianus*.

Schmidt et al., (1980, 1984) ont rapporté, dans leurs travaux, une présence abondante de cette levure dans les produits laitiers tels que le lait et les fromages. Elle fait partie de la flore microbienne normale de ces produits; vu sa capacité à utiliser le lactose, le sucre dominant du lait.

Concernant les souches VL1, VY1, FR2, FR3 et VKL1, en plus de leur multiplication asexuée qui se fait par bourgeonnement multipolaire, elles ont l'aptitude à sporuler et de former des ascospores (Tableau 15). Ainsi, la sporulation permet d'écarter les levures anascosporogènes et de les distinguer des espèces précédemment décrites.

Tableau14: Résultats des autres tests physiologiques effectués sur les souches de levures isolées.

<i>Caractères physiologiques</i>	<i>Croissance à 50% glucose</i>	<i>Résistance à l'actidione</i>	<i>L'hydrolyse de l'urée</i>	<i>L'hydrolyse de la gélatine</i>
<i>Souches isolées</i>				
<i>VL1</i>	-	+	-	-
<i>VY1</i>	-	+	-	-
<i>VY2</i>	-	+	-	-
<i>LP1</i>	-	+	+	-
<i>FR1</i>	+	+	-	-
<i>FR2</i>	-	+	-	-
<i>FR3</i>	-	+	-	-
<i>FR4</i>	+	+	-	-
<i>VKL1</i>	-	+	-	-
<i>VLV</i>	+	+	-	-

(+): Positif, (-): Négatif

Tableau15: Caractérisation des ascospores des différentes souches de levures isolées.

<i>Critères</i>	<i>Nombre de spores</i>	<i>Forme des spores</i>
<i>Souches isolées</i>		
<i>VL1</i>	4	<i>Sphériques</i>
<i>VY1</i>	4	<i>Sphériques</i>
<i>VY2</i>	<i>absence</i>	/
<i>LP1</i>	<i>absence</i>	/
<i>FR1</i>	6	<i>globulaires</i>
<i>FR2</i>	2	<i>Sphériques</i>
<i>FR3</i>	2	<i>Sphériques</i>
<i>FR4</i>	6	<i>globulaires</i>
<i>VKL1</i>	2	<i>Sphériques</i>
<i>VLV</i>	4	<i>globulaires</i>

D'après certains auteurs, **Lodder (1971)**, **Leveau et Bourgeois (1980)**, **Guiraud et Galzy (1980)**, et **Kurtzman (1990)**, les genres *Pichia* et *Kluyveromyces* présentent beaucoup de propriétés communes avec les souches de levures isolées VL1, VY1, FR2, FR3 et VKL1. Pour pouvoir différencier entre ces deux genres (*Pichia* et *Kluyveromyces*), ces auteurs utilisent le test de la fermentation des sucres comme critère distinctif.

En effet, le genre *kluyveromyces* présente en même temps, un métabolisme oxydatif et fermentaire. Contrairement au genre *Pichia*, le métabolisme est strictement oxydatif et rarement fermentaire. Seulement, quand ce dernier est présent, il est faible et très lent.

Or, d'après les tests de fermentation des sucres par les souches de levures isolées VL1, VY1, FR2, FR3 et VKL1 (Tableau 12), on constate que ces dernières fermentent diverses sources de carbone. Donc, elles ne peuvent pas appartenir au genre *Pichia* mais plutôt au genre *Kluyveromyces*.

Lodder (1971), **Kurtzman (1990)** ont remarqué que le genre *kluyveromyces* se reproduit par bougonnement multipolaire. Il est caractérisé par des cellules de formes sphériques, ellipsoïdales, cylindriques, ou allongées. Le pseudomycelium peut être formé. Le mycelium vrai est absent et les ascospores sont sphériques, ovoïdes, leur nombre varie de 1 à 16 ascospores par asque. Aussi, les nitrates ne sont pas assimilés par ce genre.

L'affiliation de chacune des souches isolées (VL1, VY1, FR2, FR3 et VKL1), aux espèces correspondantes du genre *kluyveromyces* réside dans la comparaison des tests physiologiques réalisés avec ceux des espèces *Kluyveromyces fragilis*, *kluyveromyces lactis* et *kluyveromyces marxianus* établis et décrits par **Lodder (1971)**.

D'après ce même auteur, les espèces *fragilis*, *lactis* et *marxianus* présentent des caractères physiologiques très semblables. Elles diffèrent les une des autres par les caractéristiques suivantes. L'espèce *lactis* assimile facilement le tréhalose contrairement aux espèces *fragilis* et *marxianus* qui sont incapables d'assimiler ce sucre.

Or, d'après nos résultats (Tableau 13), les souches FR2, FR3 et VKL1 assimilent bien le tréhalose. Par conséquent, elles appartiennent à l'espèce *lactis*.

Par ailleurs, la distinction entre *K. marxianus* et *K. fragilis* réside dans leur rapidité à fermenter le lactose. En effet, l'espèce *K. marxianus* fermente lentement le lactose; alors qu'il est rapidement fermenté par *K. fragilis*. La réalisation de ce test, nous a permis d'identifier les souches de levures isolées VL1 et VY1 et de les affilier respectivement aux genres *K. fragilis* et *K. marxianus* (Tableau 12).

Cependant, d'après **Barnett et al. (1979)**, la flore fongique des fromages et certains produits laitiers est constitué d'une population de levures. Au sein de ces dernières, les espèces du genre *Candida* et *Kluyveromyces* sont fortement représentées. Les produits laitiers sont considérés comme leur biotope naturel (**Kurtzman -1990**).

En conclusion, nous sommes arrivés à isoler dix souches de levures différentes à partir des produits laitiers utilisés (Tableau 16). (planche 1).

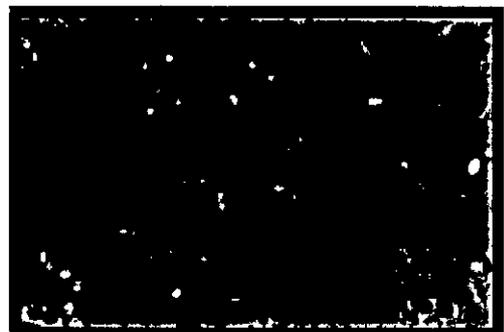
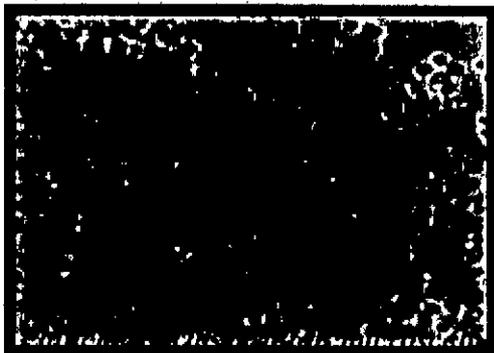
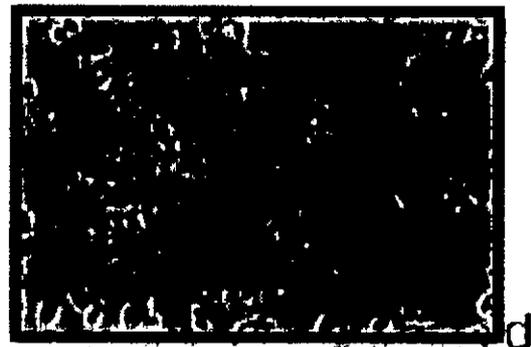
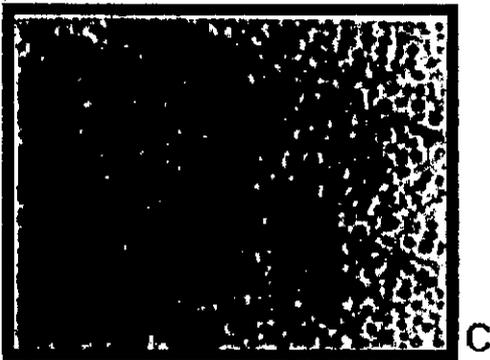
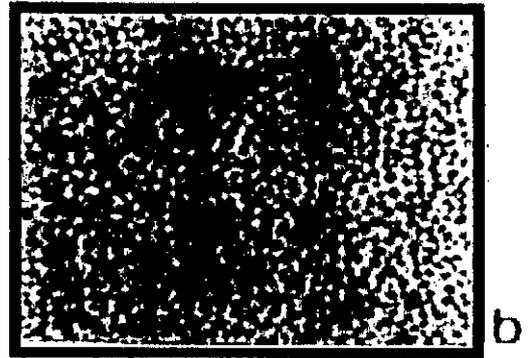


Fig. 1. Micrographs of yeast cultures isolated from chestnut products. (a): *Kluyveromyces fragilis* (Gx400); (b): *Kluyveromyces lactis* 1 (Gx100); (c): *Kluyveromyces lactis* 2 (Gx100); (d): *Kluyveromyces lactis* 3 (Gx400); (e): *Kluyveromyces marxianus* (Gx400); (f): *Schizosaccharomyces octosporus* (Gx400).

Ces souches de levures sont considérées comme des levures lactiques. La plupart d'entre elles sont cultivées sur le lactosérum pour la production de protéines d'organismes unicellulaires (Wasserman et al., 1958; 1960; 1961, Vananuvat et Kinsella -1975, Moulin et al., -1981, Sandhu et Waraich -1983, Kallel et al.; 1991).

Les levures du genre *Schizosaccharomyces* ne sont jamais utilisés pour ce but. En effet, en culture liquide agitée, ces levures développent des formes mycéliennes; dès que le milieu est appauvri en substances nutritives (Addouche et Ghouilem -1995)

Tableau 16.: Origine des différentes souches de levures isolées à partir de produits laitiers.

Souches	Echantillons	Références
<i>Schizosaccharomyces maledévorans</i>	Lait de vache cru	VLV
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Fromage à pâte molle	FR4
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	Fromage à pâte cuite	FR1
<i>Candida kefir</i>	Lait Pasteurisé	LPI
<i>Candida kefir</i>	Yaourt	VY2
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactosérum doux	VLI
<i>Kluyveromyces Lactis</i>	Fromage à pâte cuite	FR3
<i>Kluyveromyces Lactis</i>	Fromage à pâte cuite	FR2
<i>Kluyveromyces Lactis</i>	Fromage à pâte cuite	VKLI
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Yaourt	VY1

2. Culture et sélection de souches de levures performantes pour la production de POU.

La croissance des levures isolées a été testée sur un milieu synthétique ayant comme seule source de carbone et d'énergie le lactose. La culture de ces levures est réalisée en minifermementeur, selon les conditions déjà définies.

Les résultats obtenus dans le Tableau 17, montrent une très bonne croissance de *Kluyveromyces fragilis*. La phase de latence dure deux heures. La totalité du lactose est consommé au bout de 10 heures (Fig. 19), avec une vitesse de croissance de $0,35 \text{ h}^{-1}$. La transformation du lactose aboutit à la production de 10,75 g/l de biomasse (Fig. 20) avec un rendement final de 54%.

Selon les travaux de Vananuvat et Kinsella -1975, Moulin et al., 1981, Kallel et al., -1991 et Castrillo et al., -1996, la souche *Kluyveromyces fragilis* est le microorganisme eucaryote idéal pour la production de P O U.

Quand au genre *Candida*, les espèces *Candida kefyr 1* et *Candida kefyr 2* se développent moins rapidement sur ce milieu et sous les mêmes conditions opératoires. En effet, la souche *Candida Kefyr 1* métabolise la totalité du lactose contrairement à la souche *Candida kefyr 2*, après 42 heures de culture. Un temps relativement long pour une éventuelle utilisation de la souche pour la production de POU. De plus, la phase de latence de *Candida kefyr 1* dure 22 heures et le taux de croissance maximum atteint $0,28 \text{ h}^{-1}$. La biomasse finale produite est de 10 g/l . En ce qui concerne *Candida Kefyr 2*, on constate qu'elle présente une cinétique de croissance particulière. La phase de latence dure 2 heures, mais l'évolution de sa croissance va lentement avec un taux de croissance de $0,27 \text{ h}^{-1}$. Le lactose n'est pas métabolisé en entier ($57,5 \%$). La biomasse produite est moindre ($5,7 \text{ g/l}$) et avec un rendement de 45% (Fig.20).

Tableau 17: Paramètres de la cinétique de croissance des levures étudiées sur le milieu Y. P. S. L.

Souches de levures étudiées	Temps de latence (h)	Biomasse finale (g/l)	Lactose utilisé (%)	Rendement en biomasse (%)	Taux de croissance (h^{-1})
<i>K. luyveromyces lactis 1</i> K.11	16	2,5	47	23	0,07
<i>K. luyveromyces lactis 2</i> K.12	26	2,3	43	20	0,08
<i>K. luyveromyces lactis 3</i> K.13	20	3,75	49	37	0,09
<i>Candida kefyr 1</i> Ck1	22	10	100	49,5	0,28
<i>Candida kefyr 2</i> Ck2	02	5	57,5	45	0,27
<i>Kluyveromyces fragilis</i> K.f	02	10,75	100	54	0,35
<i>Kluyveromyces marxianus</i> K.m	28	10	13,5	6	0,06

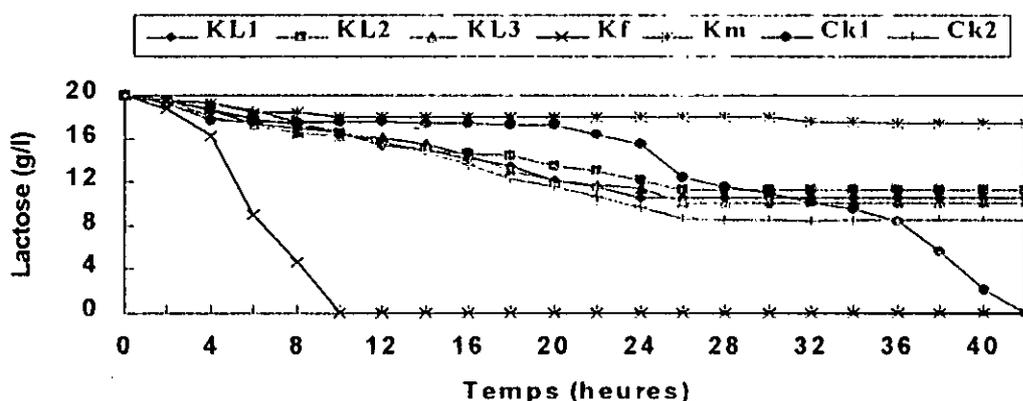


Fig. 19: Culture des levures lactiques isolées en minifermuteur sur le milieu Y.P.S.L. Variation de la concentration du lactose (g/l) en fonction du temps. (KL1: *Kluyveromyces lactis 1*, KL2: *Kluyveromyces lactis 2*, KL3: *Kluyveromyces lactis 3*, Km: *Kluyveromyces marxianus*, Kf: *Kluyveromyces fragilis*, Ck1: *Candida kefyr 1*, Ck2: *Candida kefyr 2*).

Kluyveromyces marxianus présente elle aussi, une croissance très lente sur ce milieu. Son taux de croissance atteint un maximum de $0,06 \text{ h}^{-1}$ et le lactose est faiblement assimilé (13%). Willetts et Ugalde (1987), en utilisant une collection de levures du genre *Candida Kefyr* et *kluyveromyces marxianus*, ont mis en évidence une différence d'adaptation des différentes souches sur le lactose.

Donc, il existe bien des espèces de levures appartenant à un même genre, mais dont certaines assimilent facilement le lactose. Par contre, d'autres l'assimilent faiblement.

Donc, on peut dire que les levures isolées *Candida kefy 1*, *Candida kefy 2* et *K. marxianus* ne se développent pas sur ce milieu riche en lactose. On déduit donc, qu'elles s'apprentent mal à croître sur le lactosérum.

Par ailleurs, les levures du genre *Kluyveromyces lactis* présentent une cinétique de croissance différentes des levures citées dessus (Figure 20). Le développement de ces levures paraît très long sous ces conditions. La vitesse de croissance varie entre $0,07$ et $0,09 \text{ h}^{-1}$. La biomasse produite par ces trois espèces est très faible. Le maximum en biomasse atteint $3,75 \text{ g/l}$ par *kluyveromyces lactis1*. Toute fois, le lactose est faiblement assimilé par ces levures.

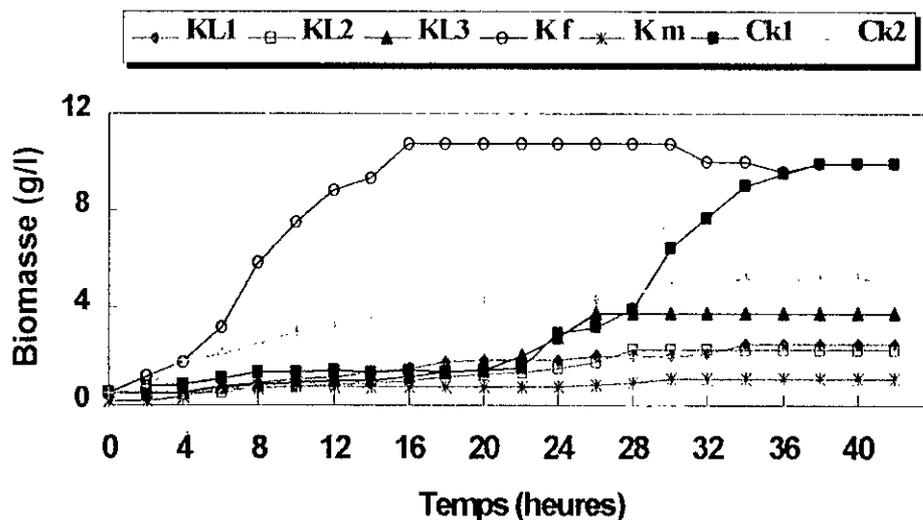


Fig. 20: Culture des levures lactiques isolées en minifermementeur sur le milieu Y.P.S.L. Variation de la biomasse (g/l) en fonction du temps. (KL1: *Kluyveromyces lactis1*, KL2: *Kluyveromyces lactis2*, KL3: *Kluyveromyces lactis3*, K m: *Kluyveromyces marxianus*, Kf: *Kluyveromyces fragilis*, Ck1: *Candida kefy 1*, Ck2: *Candida kefy 2*).

Ces levures *Kluyveromyces lactis1*, *K. lactis 2*, *K. lactis 3* présentent une croissance très lente sur ce milieu, elles sont peut être exigeantes pour certains facteurs nutritionnels tel que l'acide lactique.

Dans les industries Bel, Les levures lactiques cultivées sur lactosérum sont *kluyveromyces fragilis* qui se développe uniquement sur lactose est utilisée à 80 % et la levure *kluyveromyces lactis* à 20 % qui croit sur lactose et l'acide lactique, ces souches sont en équilibre et adaptées au milieu industriel (**Bel industrie -1997**). A la lumière des résultats obtenus, nous retiendrons parmi les souches isolées *Kluyveromyces fragilis*. Elle paraît bien adaptée à la production de POU à partir du lactosérum. Ceci est due en raison des besoins moindre en éléments nutritifs, des courts temps de génération et des hautes concentrations cellulaires atteintes.

Par ailleurs, selon une étude réalisée par Fiedurek et Szczodrak (1994) sur la sélection de souches de levures, ayant une aptitude à dégrader le lactose comme seule source de carbone, il a été démontré que leur capacité à métaboliser le lactose est reliée à l'activité de la β galactosidase (l'enzyme qui scinde le lactose en glucose et galactose). Aussi, ils ont constaté que cette activité enzymatique est directement liée aux conditions physico-chimiques du milieu de culture.

En effet, parmi les 10 souches de levures utilisées dans cette étude, appartenant à des genres différents à savoir le genre *Fabospora*, *Candida*, *Kluyveromyces* et *Saccharomyces*, seules *Kluyveromyces fragilis* et *Fabospora fragilis* ont présenté une activité enzymatique de la β -galactosidase.

Ainsi, la croissance de ces levures est influencée par les conditions opératoires. Et exigent pour leur développement des conditions particulières pour activer la β galactosidase cellulaire.

2. 1. Culture de *kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi

2. 1 1. Culture discontinue

2. 1. 1. 1. Culture en minifermuteur

Avant d'entamer les prochaines expériences, nous avons procédé à l'analyse biochimique du lactosérum utilisé (Tableau 18).

Tableau 18: Composition biochimique en valeurs moyennes du lactosérum utilisé

Paramètres	Valeurs mesurées
<i>Matière minérale</i>	0,9 %
<i>Matière sèche</i>	0,2 %
<i>Matière grasse</i>	7,9 %
<i>Lactose</i>	6,4 %
Pour 100g de matière sèche (mg)	
<i>Phosphore</i>	784,81
<i>Calcium</i>	1268
<i>Azote protéique (x 6.25)</i>	11 %
<i>Azote non protéique</i>	0.24 %

Au cours des expériences précédentes, nous avons constaté que *Kluyveromyces fragilis* avait beaucoup de prédispositions à métaboliser le lactose et le transformer en biomasse.

Afin d'arriver à de meilleurs rendements, nous avons essayer d'optimiser les conditions de culture de cette levure sur lactosérum doux déprotéiné enrichi. La croissance de la souche *kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi a permis, dans un premier temps, d'étudier sa cinétique de croissance (Fig. 21).

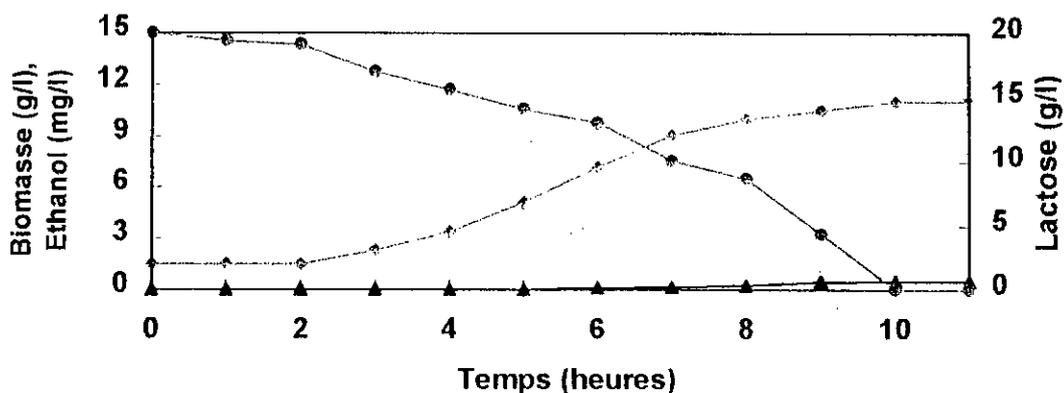


Fig. 21: Culture en mini-fermenteur de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Etude de la cinétique de production de biomasse (—◆—), d'éthanol (—▲—) et de la consommation du lactose (—●—) en fonction du temps.

Dans les conditions préalablement définies, la totalité du lactose initialement présent, soit 20g/l, est métabolisé au bout de 10 heures de culture. La biomasse atteint une valeur de 11 g/l. Après une phase de latence de 2 heures, la phase exponentielle se met en place et dure 6 heures, au cours desquelles le taux de croissance atteint une valeur de $0,35 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 22a).

Pendant cette période, on observe une diminution du lactose présent (Fig. 21^a). En effet, la vitesse spécifique d'utilisation du substrat diminue (Fig. 22b). Ce qui se traduit par une augmentation du rendement instantané en biomasse (Fig. 22c). Ce phénomène pourrait s'expliquer par une accumulation, préalable du lactose à l'intérieur de la cellule (Agnes 1986).

Après la phase exponentielle, on remarque qu'entre la 10^{ème} et la 16^{ème} heure, la vitesse spécifique de production de biomasse diminue plus rapidement que la vitesse spécifique d'utilisation du substrat. Ce qui se traduit par une baisse du rendement instantané. L'apparition d'éthanol à ce moment là, puis son accumulation dans le milieu explique ce phénomène.

Dans la mesure où une partie du substrat est utilisée pour la formation de métabolites secondaires au dépend de la production d'énergie nécessaire à la synthèse de la biomasse. Le rendement total en biomasse atteint 55 %.

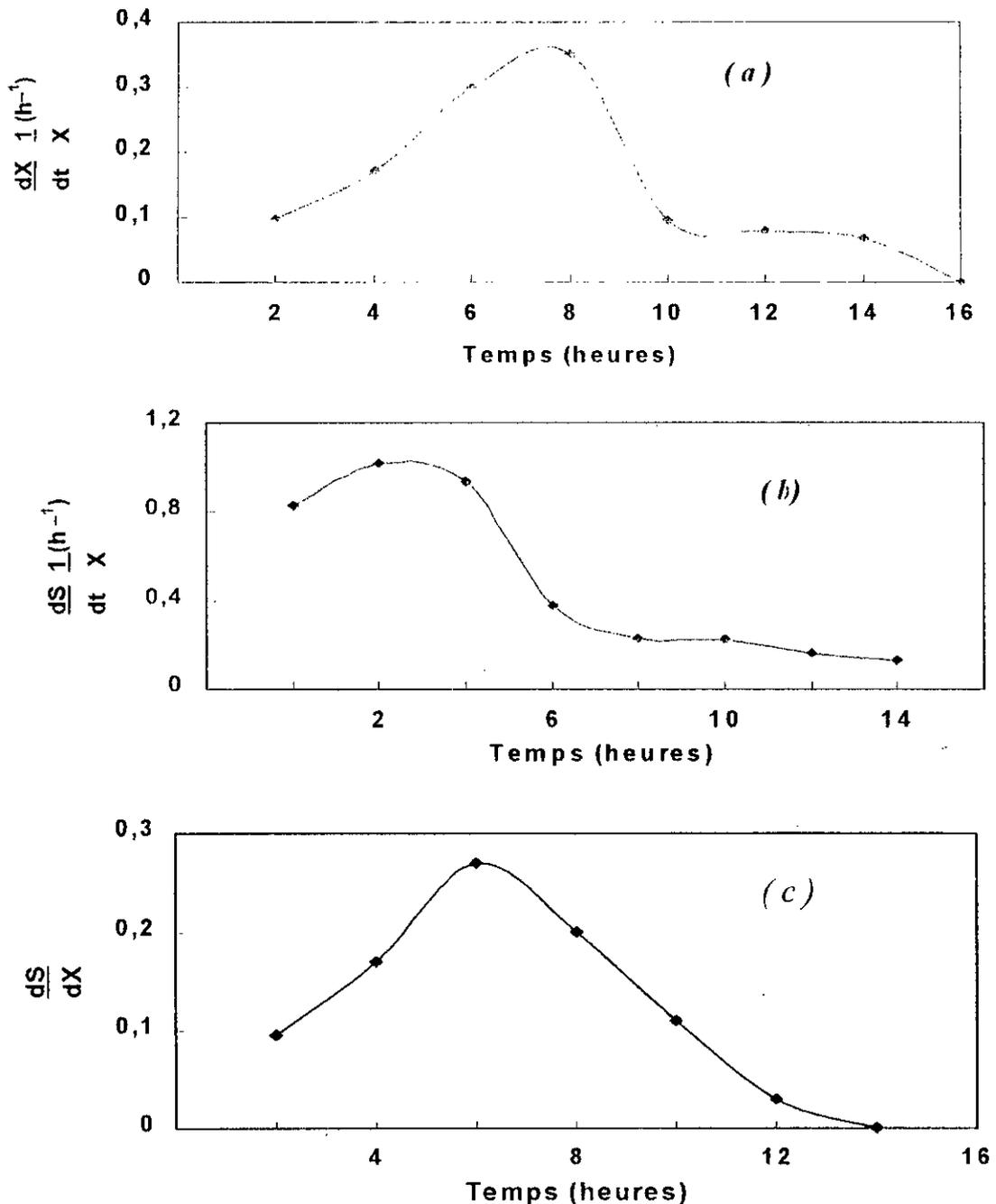


figure22: Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en mini-fermenteur sur lactosérum déprotéiné enrichi Variation des vitesses spécifiques de production de biomasse (a), de l'utilisation du lactose (b) et du rendement instantané (c) en fonction du temps.

Le pH initial du milieu est de pH 4,6. En absence de régulation de pH (Fig. 23), on enregistre une légère acidification du milieu ($4,1 \pm 0,2$). Cette acidification du milieu peut être attribuée à certains facteurs tels que la dissolution du dioxyde de carbone et sa transformation en acide carbonique, l'accumulation des ions H^+ due à la transformation du lactose en éthanol. Le pH tend ensuite vers sa valeur initiale avec l'apparition de l'éthanol dans le milieu.

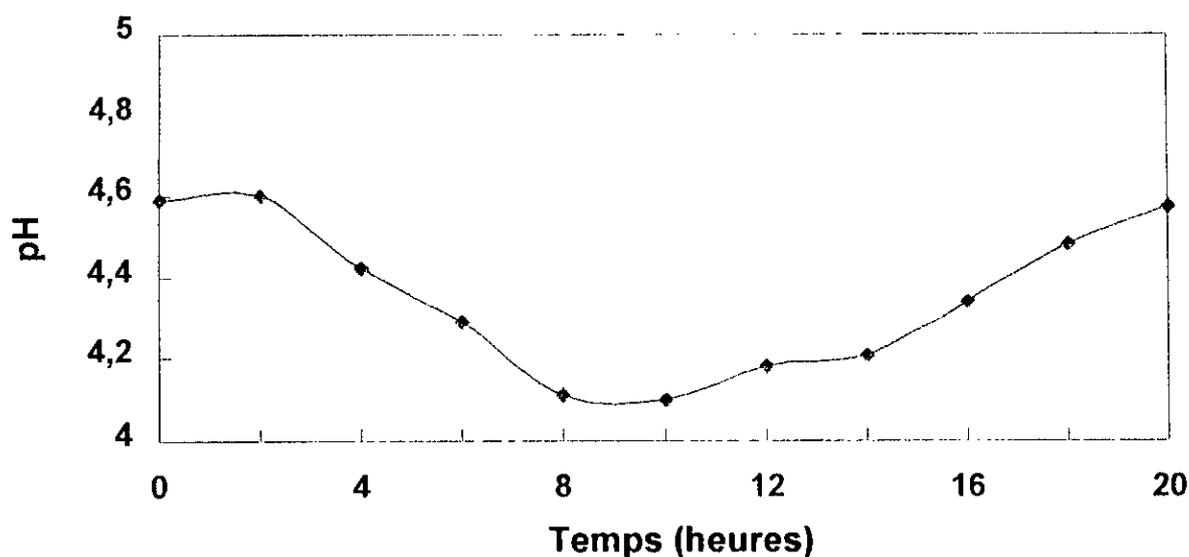


Fig. 23: Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en minifermuteur sur lactosérum déprotéiné enrichi : Variation du pH en fonction du temps.

Influence de la température sur la croissance de *Kluyveromyces fragilis*

Chaque micro-organisme, quelque soit son espèce, est caractérisé par une température optimale de croissance pour laquelle le taux de croissance est le plus élevé. Ainsi, des températures de 25, 30, 37 et 40°C ont été testées lors de la culture en minifermuteur (Fig. 24 et 25).

Le taux de croissance apparaît maximum à 40°C et atteint 0,29 h⁻¹. De plus, on remarque que le rendement diminue de façon importante par rapport à ceux observés à des températures inférieures (Fig. 24).

En effet, à la température de 25°C, la levure présente une phase de latence importante qui dure 12 heures de culture. Par la suite, la phase exponentielle est entamée avec un taux de croissance maximal de l'ordre de 0,11 h⁻¹. La transformation totale du lactose ne se fait qu'après 20 heures de culture. Le rendement en biomasse est de 43,5%.

Pour la production de biomasse, une température de 30°C est plus conforme. Elle permet d'obtenir de meilleurs rendements en biomasse (51%). Il est utile d'entreprendre des essais à des températures supérieures à 40°C.

D'après les travaux de **El- Samragy et Zall (1988)**, la température optimale de croissance de la souche *Kluyveromyces fragilis* est de 32°C. Mais, selon **Janssens et al., (1984)**, **Fiedurek et Szczodrak (1994)**, la température de 30°C est considérée comme optimale pour le développement de la souche *Kluyveromyces fragilis*. Ce qui est en accord avec nos résultats.

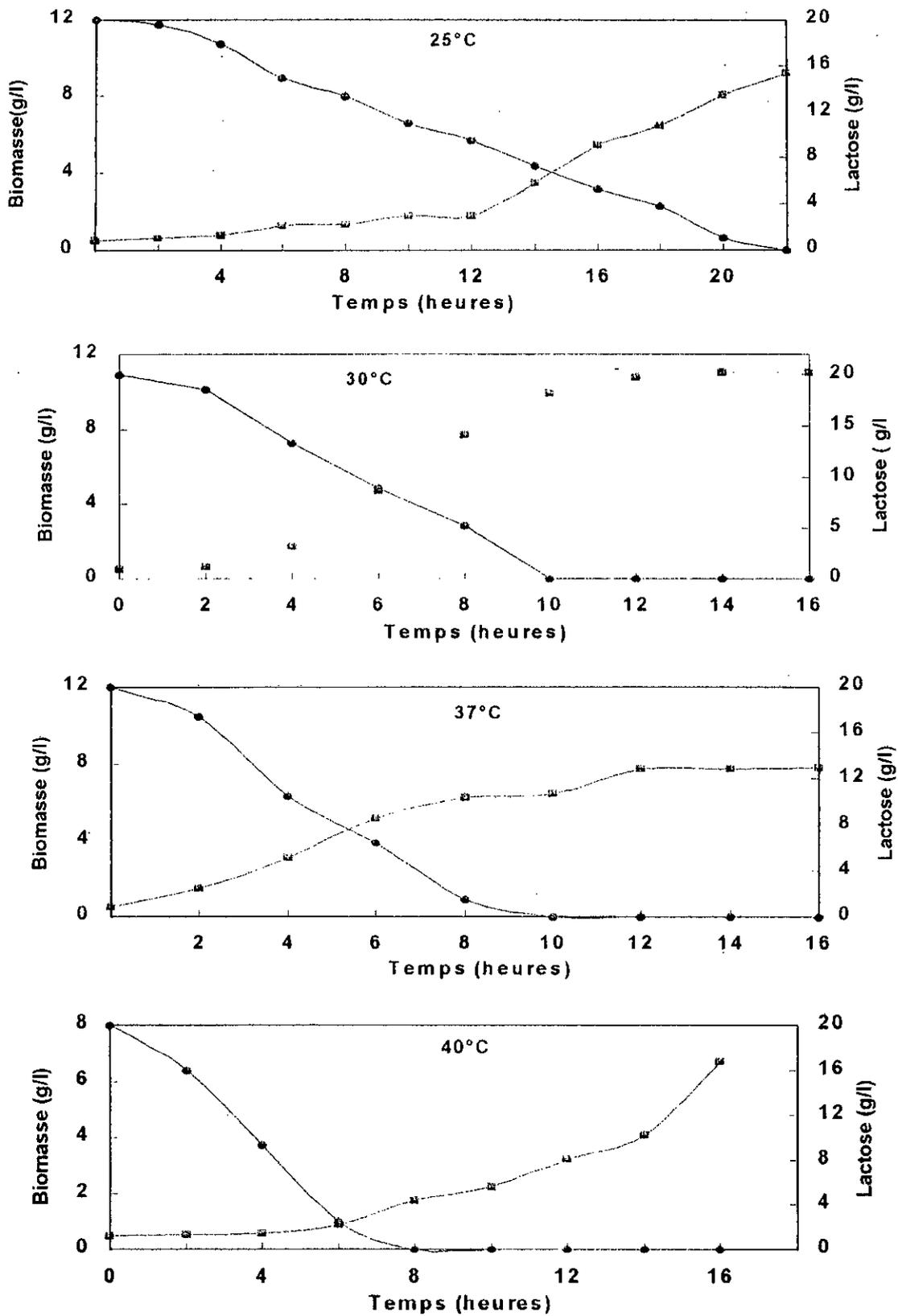


Fig.24 : Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en mini-fermenteur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence de la température sur la production de la biomasse (—■—) et sur l'utilisation du lactose (—●—).

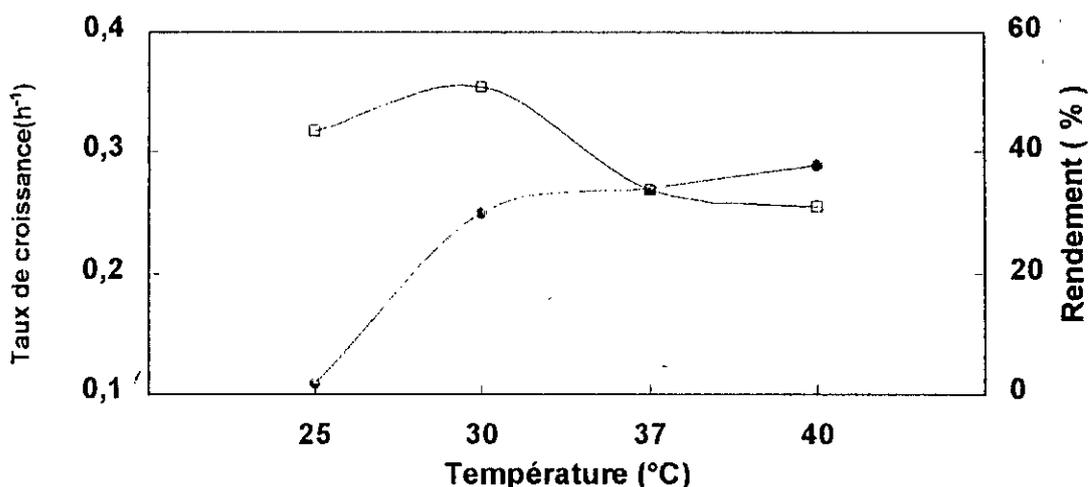


Fig. 25: Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en minifermementeur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence de la température sur le taux de croissance (—●—) et le rendement en biomasse (—□—).

Influence du pH sur la croissance de *kluyveromyces fragilis*.

L'effet du pH sur l'ensemble de l'activité cellulaire est également important. Et chaque micro-organisme est caractérisé par un pH optimal, pour lequel le taux de croissance est le plus élevé.

En vue de la Figure 26, l'allure des courbes obtenues pour les différents pH est semblable à celles obtenues lors de l'étude de l'influence de la température en fonction du temps. La vitesse spécifique de production paraît maximum à pH 4,5. Elle atteint 0,27 h⁻¹ avec un rendement de biomasse de 51 % (Fig. 27). Mais, à pH 3, le rendement et la vitesse spécifique de production diminuent de façon importante (29,5 %). Le même phénomène est observé à pH 6.

La vitesse de croissance spécifique maximum atteint 0,21 h⁻¹. Donc, il serait inutile de réaliser des essais à des pH inférieur à pH 3 ou supérieur à pH 6. Par ailleurs à pH 5,5, le rendement final en biomasse reste toujours inférieur à celui obtenu à pH 4,5 (44%).

D'après nos résultats, le pH optimal de croissance de *Kluyveromyces fragilis* est égale à 4,5. D'après la littérature le pH optimal de la croissance de *Kluyveromyces fragilis* diffère d'un auteur à un autre.

Selon Wasserman et Hampson (1961), il est de 5.5. El -Samragy et Zall (1988) considèrent qu'il est de 5. D'autre part, King et Zall (1983), et Gianetto et al., (1986) trouvent qu'une légère modification du pH ne présente aucun effet sur la cinétique de croissance des levures.

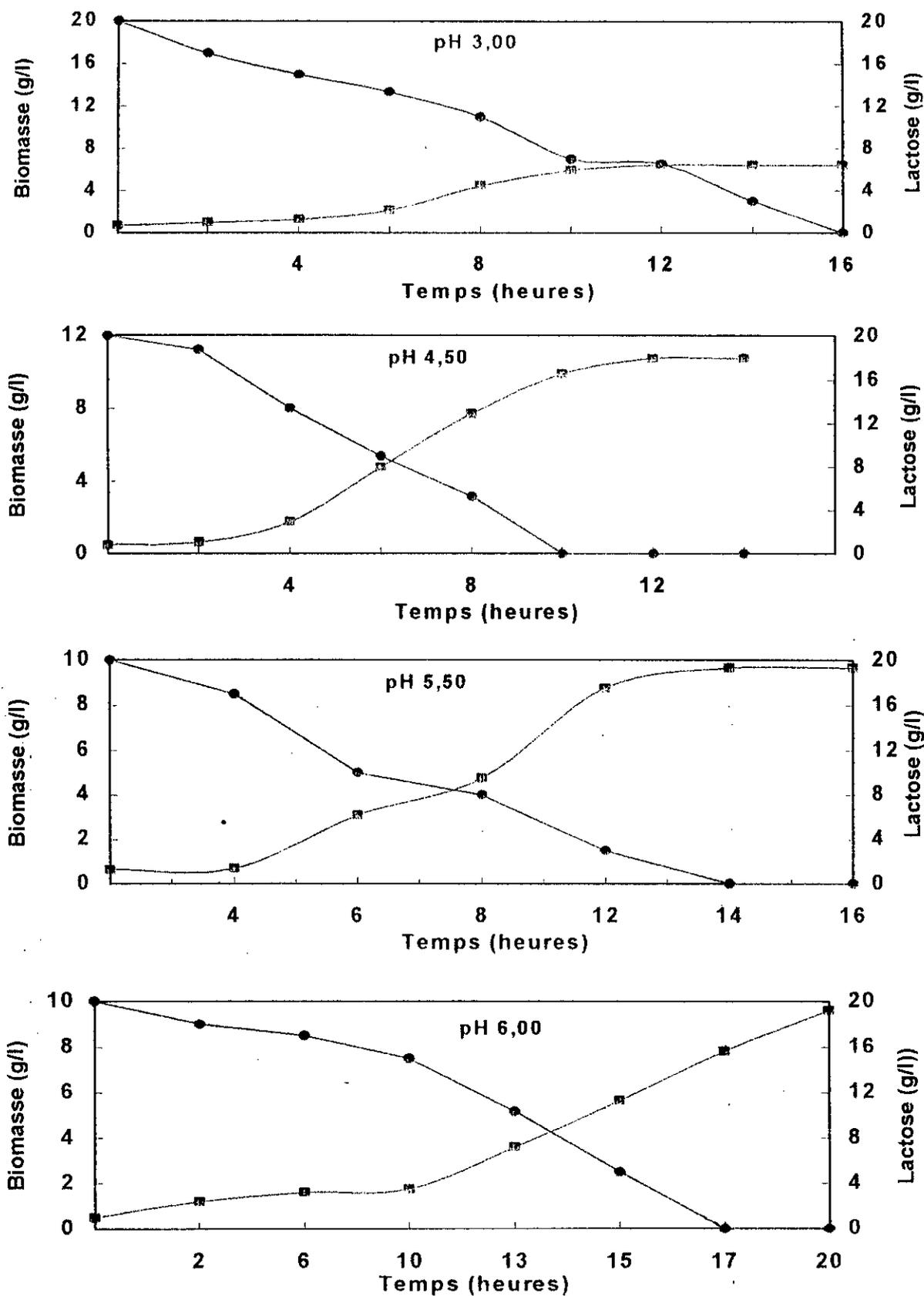


Fig.26: Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en minifermuteur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence du pH sur la production de la biomasse (—■—) et sur l'utilisation du lactose (—●—).

Ghaly et El- Taweel (1995) rapportent dans leur étude qu'une modification du pH entre 4,2 à 4,8 ne présente aucun effet sur la capacité de cette levure à assimiler le lactose. Ainsi, le contrôle du pH au cours de cette étude peut ne pas sembler nécessaire.

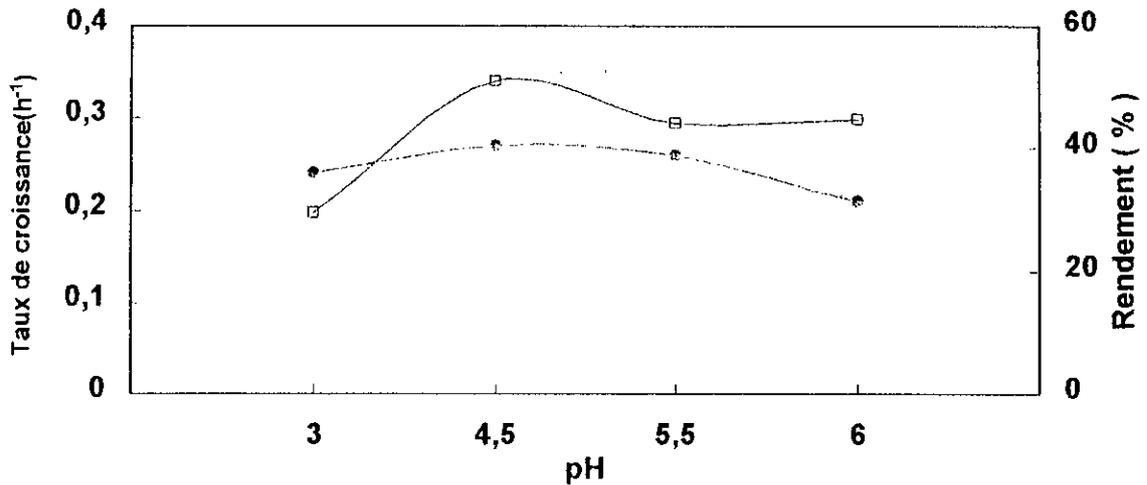


Fig. 27: Culture de la souche *Kluyveromyces fragilis* en minifermuteur sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence du pH sur le taux de croissance (—●—) et le rendement en biomasse (—□—).

Influence de la concentration en lactose sur la cinétique de croissance de *Kluyveromyces fragilis*.

Pour les essais de fermentations, on a utilisé du lactosérum doux avec différentes concentrations en lactose.

Le lactosérum dont la concentration initiale en lactose est de 64 g/l est dilué de façon à amener la concentration en lactose à 40, 30, et 20 g/l. On constate, alors; (Tableau 19 et Fig. 28), l'apparition d'un métabolisme fermentaire à des hautes concentration en lactose (40 g/l). Ainsi, le rendement se trouve nettement réduit.

Tableau 19: Culture discontinue en minifermuteur de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum doux déprotéiné enrichi. Résultats obtenus après dilution du lactosérum en concentration du lactose.

Concentration en lactose (g/l)	Biomasse (g/l)	Ethanol (mg/l)	Rendement (%)
20	11	0,5	55
30	10,4	4	34,66
40	11,05	6	28

La conduite de la fermentation sur lactosérum dilué à 20 g/l conduit à de meilleurs rendements et à une consommation totale de lactose. Le métabolisme fermentaire est nettement atténué, après dilution du lactosérum.

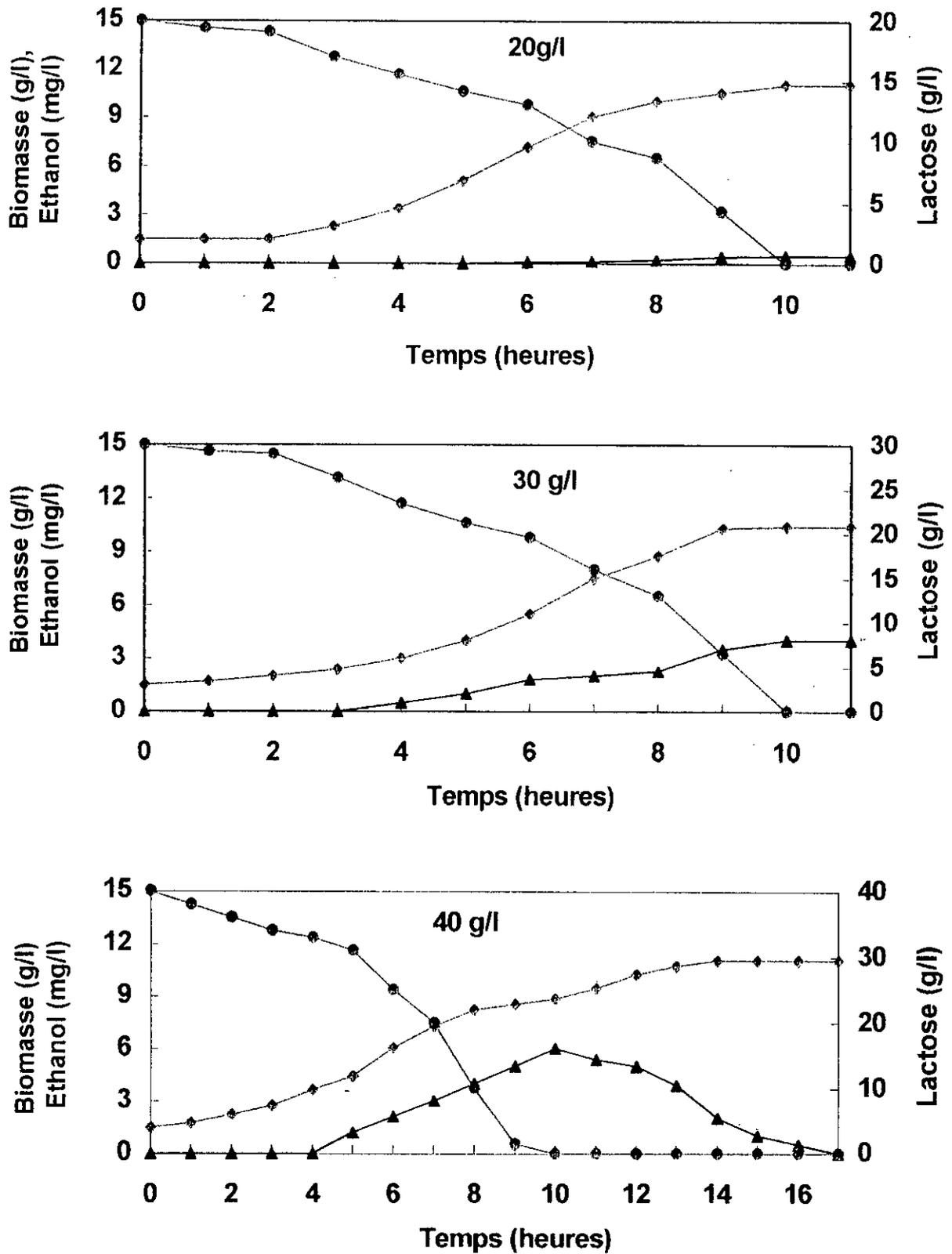


Fig. 28: Culture en minifermementeur de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Influence de la concentration en lactose (—●—) sur la production de biomasse (—○—) et de ethanol (—▲—) en fonction du temps.

Ainsi, le rendement est nettement réduit (34,66 %) à des concentrations supérieures en lactose (30 g/l). La teneur en éthanol accumulée est dans ces conditions importante.

L'utilisation du lactosérum dilué à 40 g/l permet la production de 11 g/l de biomasse. Seulement, cette expérimentation permet, aussi, de montrer que l'éthanol initialement accumulé (6 mg/l) est ensuite utilisé comme nouveau substrat carboné (phénomène de diauxie). La levure entame, alors une nouvelle phase de croissance avec une très courte phase de latence. La voie métabolique empruntée étant alors le cycle du glyoxylate (Fig. 28). Le rendement total en biomasse (R_x) obtenu après utilisation successive du lactose et la formation de l'éthanol est de 28 %.

En effet, selon les travaux de **Bourgeois et Leveau (1980)**, chez les levures appartenant à l'espèce *Kluyveromyces fragilis*, le métabolisme respiratoire est très actif par rapport au métabolisme fermentaire. L'oxygène de l'air inhibe le métabolisme fermentaire.

L'activité des enzymes de la glycolyse est diminuée. C'est l'effet Pasteur; il y a croissance des cellules avec une production en éthanol. Cette espèce présente une forte activité respiratoire en présence de glucose, de galactose ou de lactose. Mais a une activité fermentaire très réduite en présence de ces trois substrats. En présence de 20 g/l de lactose et en milieu aéré, l'activité respiratoire des cellules est dix fois plus forte que son activité fermentaire.

De plus, **Vienne et Von Stockar (1985)** constatent que la vitesse d'utilisation du lactose au cours de la croissance de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur le perméat de lactosérum diminue; quand la concentration du lactose augmente de 50g/l à 150 g/l.

Ghaly et El- Taweel (1995) ont montré qu'à une concentration en lactose supérieure à 100 g/l, le métabolisme oxydatif est fortement inhibé.

Toute fois, il faut noter que ces expériences sont conduites dans de bonnes conditions d'aération (concentration en oxygène dissous de 100 % de la saturation). Donc, l'apparition de la voie fermentaire ne peut s'expliquer que par l'augmentation de la concentration du lactose par répression catabolique et non par une limitation de l'oxygène dissous.

Il est, généralement, connu que quelque soit le degré d'aération, et au dessus d'une certaine concentration en lactose dépassant un seuil limite, la production d'éthanol ne peut être évitée. Ce qu'on appelle l'effet Crabtree (**Damiano et al., 1985**)

2. 1. 1. 2. Culture en réacteur de deux litres

La culture de *Kluyveromyces fragilis* en fermenteur de 2 litres a été conduite, selon les conditions déjà décrites. La teneur en oxygène dissous est réglée à 100 % de la saturation. Deux expérimentations ont été menées dans ces conditions; mais avec deux vitesses d'agitation différentes.

La première culture effectuée avec une vitesse d'agitation élevée de 800 tr / mn a permis l'obtention de 11 g/l de biomasse en 10 heures; à partir de la totalité du lactose initial (Fig. 29).

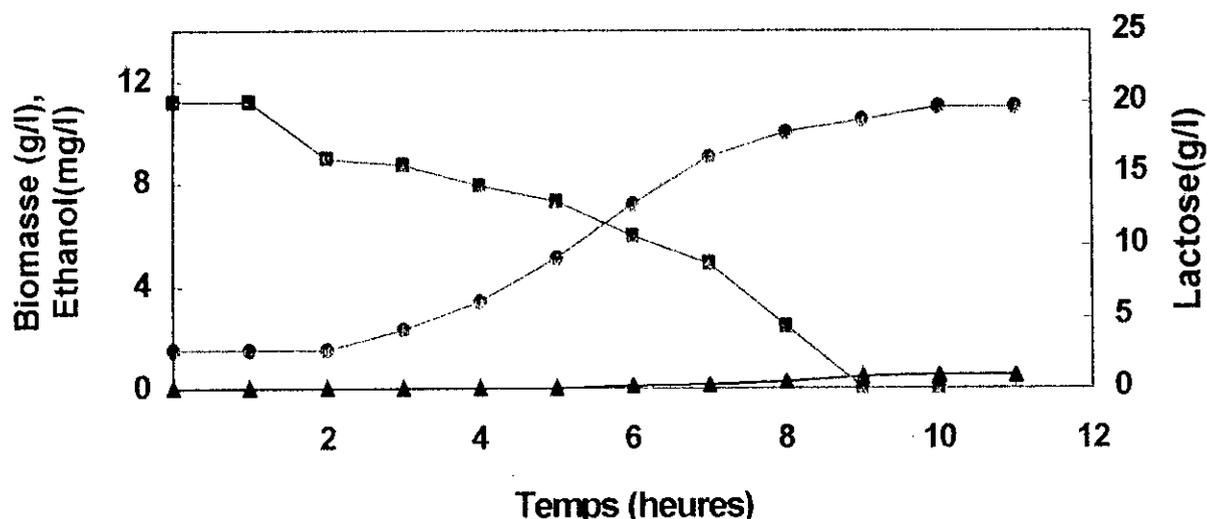


Figure 29: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2l sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 800 tr/min.) :Variation de la biomasse (—●—), de la concentration en lactose (—■—) et de la production d'éthanol (—▲—) en fonction du temps.

Les variations des vitesses spécifiques de production de biomasse ($\mu_{\max} = 0,37 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 30 a), de l'utilisation du substrat (Fig. 30 b) et celle du rendement instantané (Fig. 30 c), au cours de la croissance, se rapprochent beaucoup de celles enregistrées en minifermuteur.

Cependant, on observe plus nettement la corrélation qui paraît exister entre la vitesse spécifique d'utilisation du substrat et l'apparition de l'éthanol. En effet, au bout de la 6^{ème} heure, l'apparition de ce métabolite coïncide avec l'augmentation de la vitesse spécifique d'utilisation du substrat.

En effet, au bout de la 6^{ème} heure, quand la vitesse spécifique d'utilisation du substrat atteint son maximum, on commence à observer une apparition de l'éthanol dans le milieu réactionnel (Fig. 29 et 30 b).

Par ailleurs, on constate que le rendement instantané tend à baisser avec l'apparition de l'éthanol. Le rendement final en biomasse atteint alors 55 %.

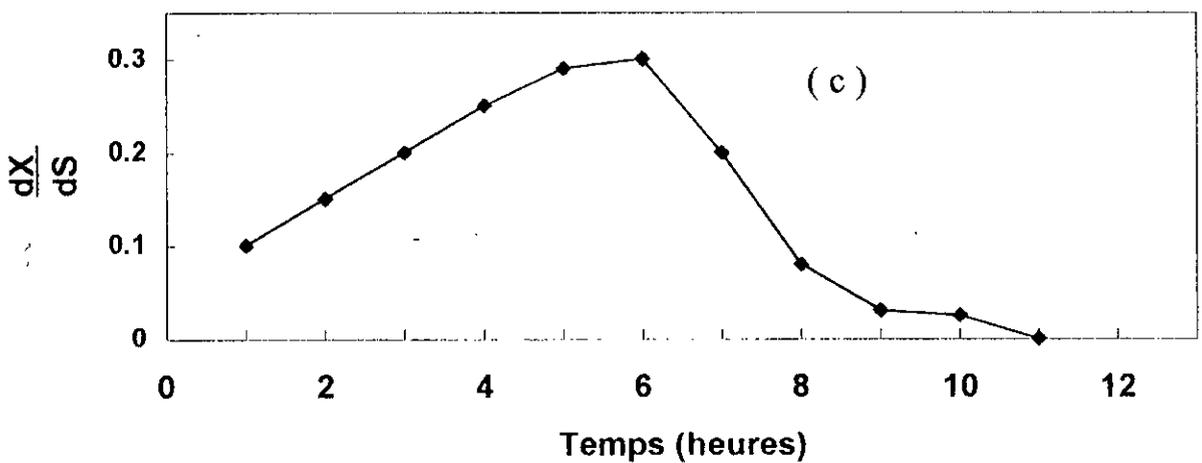
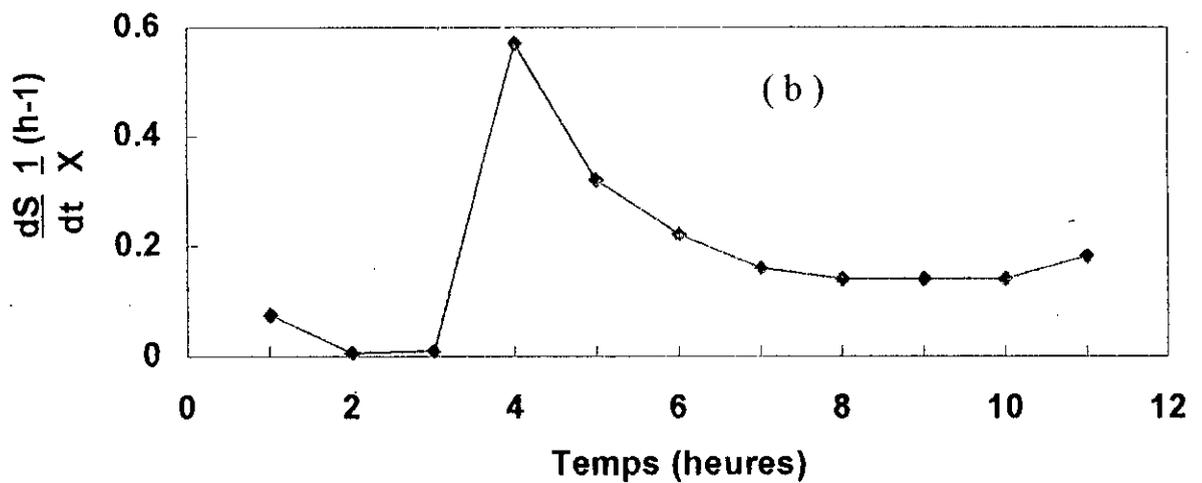
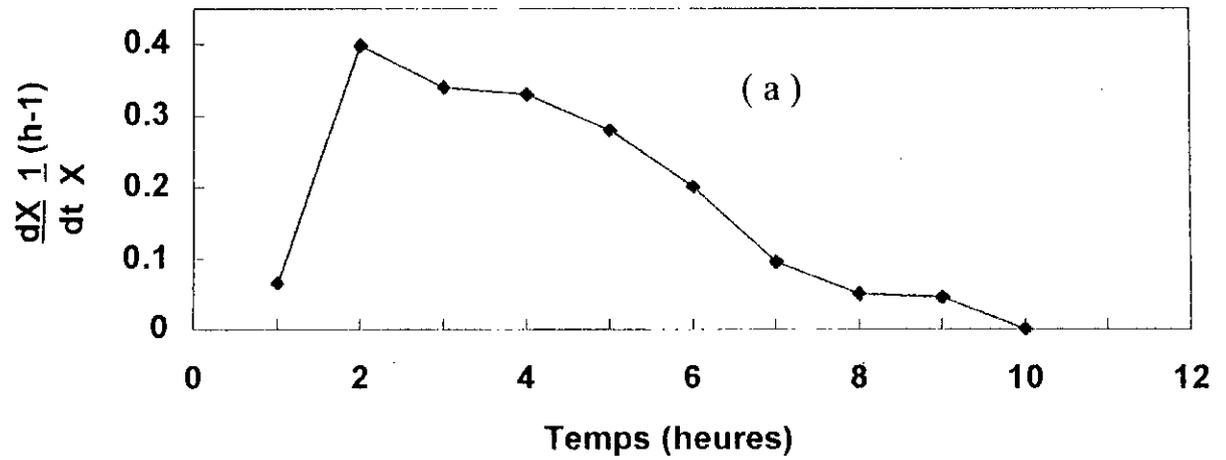


Figure 30: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 800 tr/min). Variation des vitesses spécifiques de la production de biomasse (a), d'utilisation du lactose (b) et du rendement instantané (c) en fonction du temps.

Il faut noter, aussi qu'au cours de la phase exponentielle, on observe une nette diminution du pourcentage de saturation en oxygène dissous (Fig. 31). Elle arrive à un minimum de 13 % de la saturation. Le seuil critique d'inhibition estimé par la plupart des auteurs à 10% de la saturation n'est pas atteint ici. L'oxygène dissous est fortement utilisé dans les réactions de biosynthèses cellulaires. Il est générateur de l'énergie cellulaire.

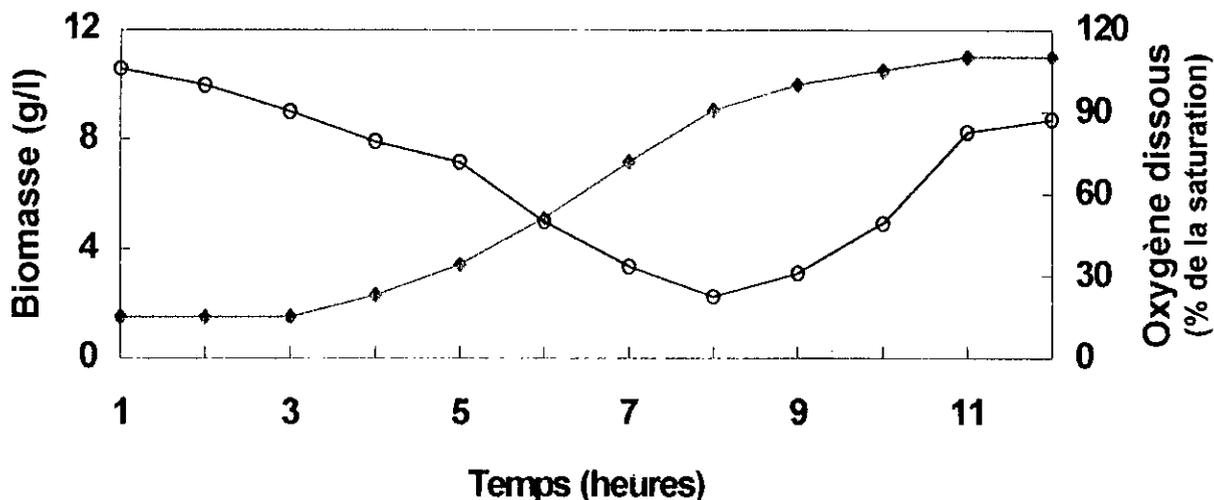


Fig. 31: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2 l de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 800 tr /min.): Variation de la biomasse (—■—) et de la concentration en oxygène dissous (—○—) en fonction du temps.

Et lorsque la culture est conduite dans des conditions d'agitation différentes 400 tr/mn (Fig. 34), les résultats obtenus sont voisins de ceux enregistrés; lors de la culture à 800 tr/mn. On note alors, une diminution de la vitesse spécifique de la production de la biomasse ($\mu_{max} = 0,27 \text{ h}^{-1}$) (Fig. 33 a). La totalité du lactose consommé ne produit que 10 g/l de biomasse avec un rendement final de 47,5%. Soit une réduction de 7,5 % par rapport au rendement obtenue à 800 tr/mn.

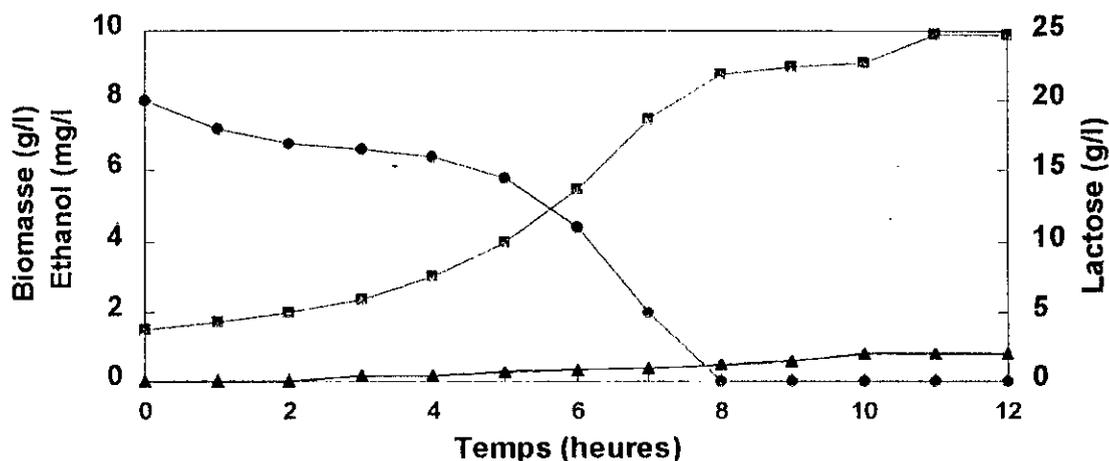


Fig. 32: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 400 tr/min.). Variation de biomasse (—■—), de la concentration en lactose (—●—) et de la production d'éthanol (—▲—) en fonction du temps.

Par ailleurs, on constate une apparition précoce de l'éthanol avec une légère augmentation de sa teneur dans le milieu (0,8 mg/l) (Fig. 32). Ce qui coïncide avec l'élévation de la vitesse spécifique d'utilisation du substrat (Fig. 33 b). En parallèle, le rendement instantané en biomasse diminue (Fig. 33 c). L'apparition précoce de l'éthanol, puis son accumulation dans le milieu explique ce phénomène. Dans la mesure où une partie du substrat est utilisée pour la formation des métabolites aux dépens de la production d'énergie nécessaire à la synthèse de biomasse.

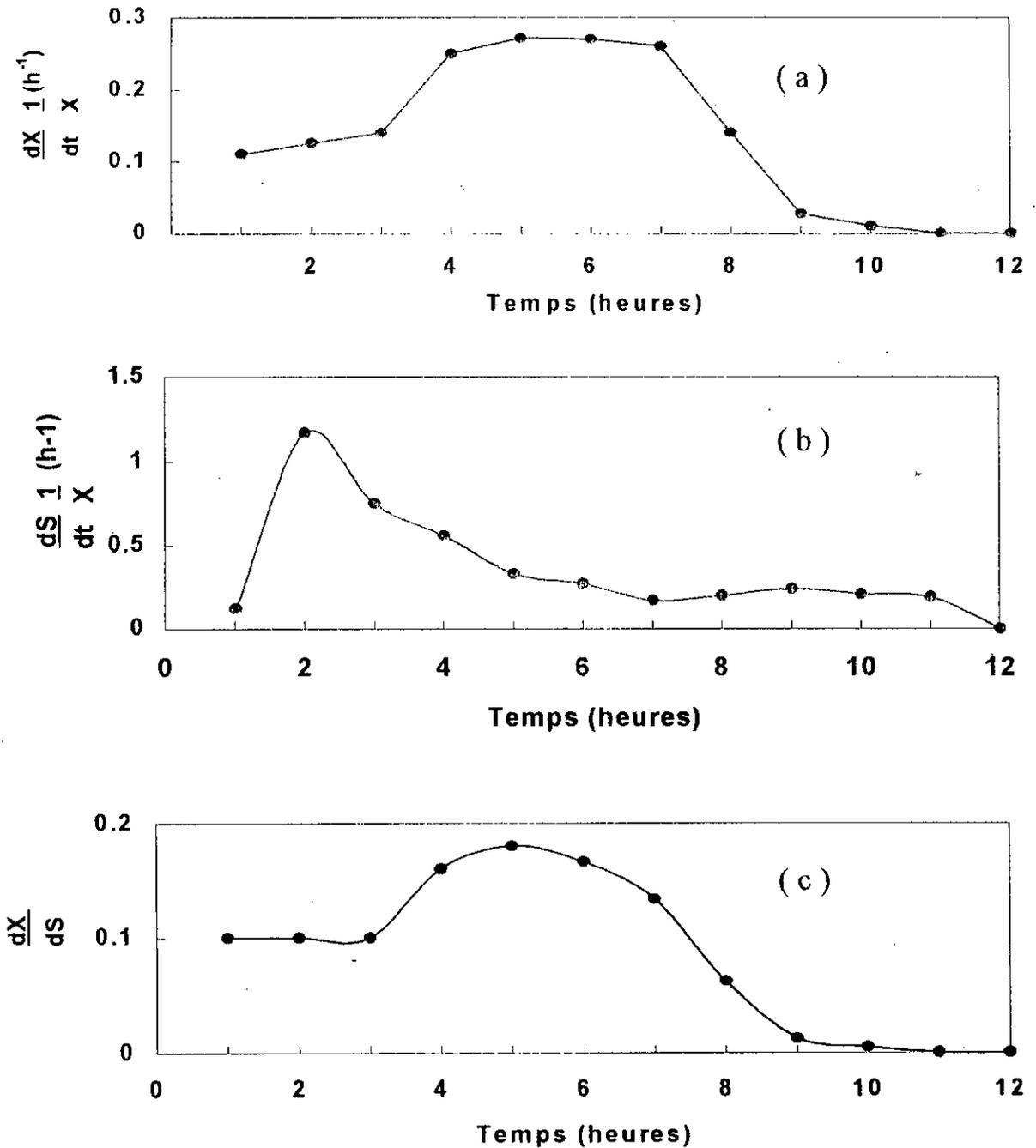


Fig. 33: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 400 tr /min): Variation des vitesses spécifiques de production de biomasse (a), d'utilisation du lactose (b) et du rendement instantané (c) en fonction du temps.

Toute fois, on constate qu'il semble y avoir une corrélation importante entre l'apparition de l'éthanol avec la dissolution de l'oxygène dissous dans le réacteur. En effet, pendant la phase exponentielle de croissance, la diminution de la concentration en oxygène dissous atteint un minimum de 45 % de la saturation (Fig. 34).

Ce qui favorise une production faible en éthanol, au détriment de la synthèse de biomasse. On voit, ainsi que sous une agitation rapide, la dissolution de l'oxygène étant plus grande et donne de meilleurs résultats.

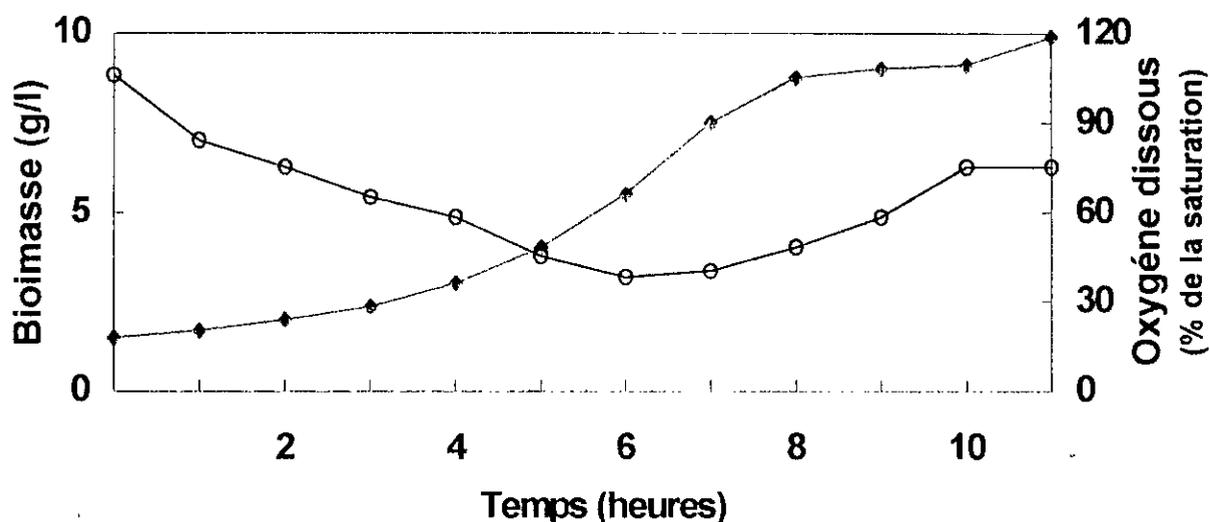


Fig. 34 : Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 2 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. (agitation 400 tr /min.) : Variation de la biomasse (—◇—) et de la concentration en oxygène dissous (—○—) en fonction du temps.

Ainsi, l'agitation permet l'introduction de l'air dans le milieu de culture. Ce qui favorise la formation de nouvelles cellules. Ceci limite de façon appréciable la production d'éthanol.

En même temps, l'agitation permet aussi l'évacuation du gaz carbonique produit lors des échanges cellulaires et le renouvellement du microenvironnement cellulaire par l'apport de nouvelles substances nutritives.

2. 1. 1. 3. Culture en réacteur de 5 litres

La culture de *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 5 litres a été conduite dans les conditions déjà décrites précédemment.

Le lactosérum dont la concentration initiale en lactose est de 64 g/l est diluée à 30 g/l. Dans ces conditions, la totalité du lactose initialement présent est transformé en de biomasse (Fig. 35).

En effet, après une phase de latence qui dure environ 3 heures, la phase exponentielle se met en place avec un taux de croissance de $0,40 \text{ h}^{-1}$. Un taux relativement élevé par rapport à celui enregistré en réacteur de 2 litres et en minifermement.

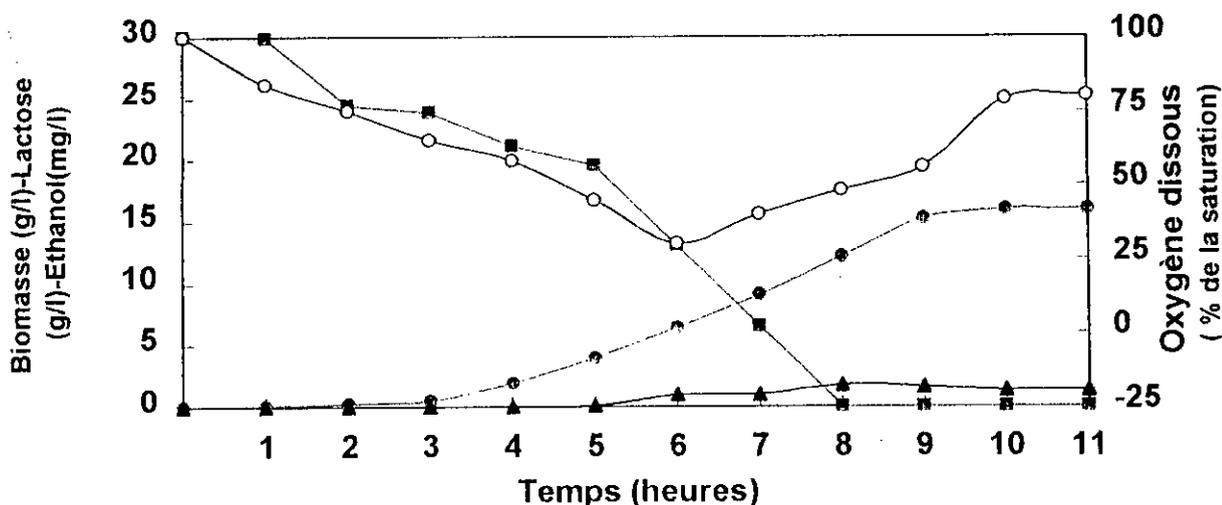


Fig.35: Culture discontinue de la souche *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 5 l sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), de l'utilisation du lactose (—■—), la production d'éthanol (—▲—) et de la concentration en oxygène dissous (—○—) en fonction du temps.

La totalité du lactose est métabolisée au bout de 8 heures de culture. La biomasse produite atteint, alors, 14.5 g/l avec un rendement de 48%.

Malgré les conditions d'aération, la teneur en oxygène dissous étant régulée à 100% de la saturation. On assiste à une légère production d'éthanol (2 mg/l), pendant la phase exponentielle. Au cours de ce laps de temps, les échanges cellulaires sont importants et sont dus aux réactions de biosynthèses cellulaires. La concentration en oxygène dissous diminue ainsi jusqu'à 30% de la saturation.

Nous avons constaté qu'en utilisant un réacteur de 5 litres, la biomasse est importante dans le réacteur par rapport à celle obtenue en minifermenteur. Lors de l'étude de l'effet de la concentration en lactose, le rendement en biomasse était de 35%. Cette augmentation est liée à la capacité du réacteur à transférer l'oxygène dissous vers les cellules microbiennes.

La mesure du K_{la} , coefficient traduisant la capacité de transfert d'un réacteur, a été effectuée par la méthode statique. Cette méthode est conduite dans le milieu de culture contenant du lactosérum déprotéiné enrichi et dépourvu de levures. Cette technique permet de déterminer la valeur du K_{la} dans les conditions où se déroulera la fermentation: une aération de 1,6 vvm et une agitation de 700 tr/mn.

Après saturation du milieu en air, on injecte de l'azote jusqu'à diminution totale de la concentration en oxygène dissous. On reprend, alors l'injection de l'air.

L'élévation de la concentration en oxygène dissous, après la reprise de réinjection de l'air, est représentée sur le graphe de la Figure 36. Le K_{la} calculé à partir des résultats expérimentaux a été estimé à 110 h^{-1} .

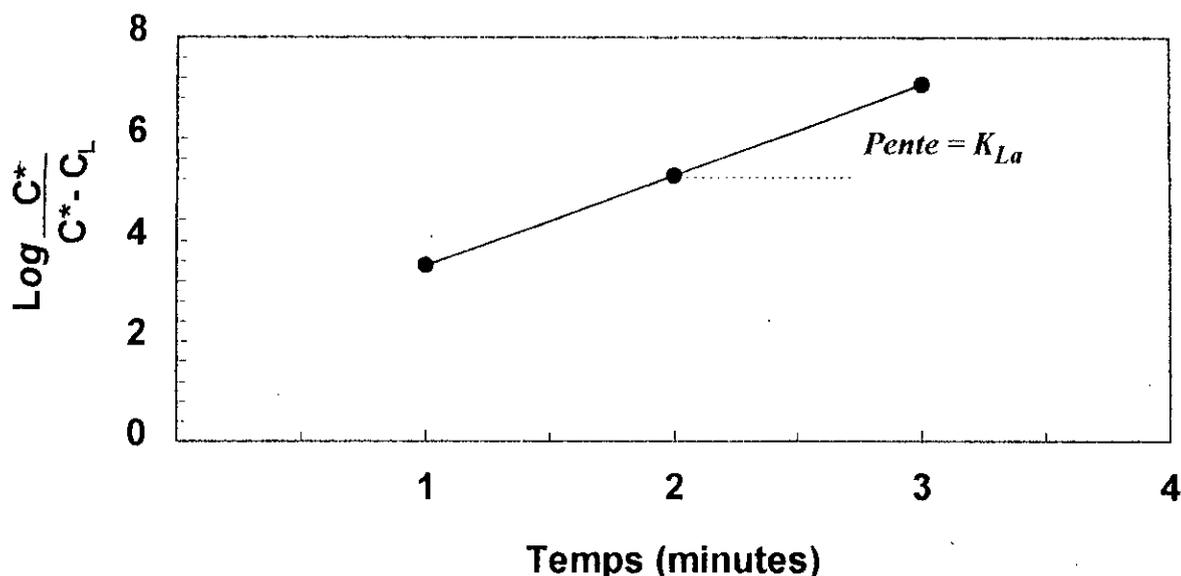


Fig. 36: Détermination graphique du K_{La}

En conclusion, cette étude préliminaire sur la connaissance des conditions de culture de *Kluyveromyces fragilis*, ainsi que sa cinétique de croissance en culture discontinue sur le lactosérum permet de tirer les conclusions suivantes:

- Le pH optimum de croissance de cette souche est égale à 4,5.
- La température optimum se situe aux alentours de 30°C.
- Le taux de croissance peut atteindre une valeur de 0,40 h⁻¹, en fermenteur de 5 l avec une production de biomasse produite de 14.5 g/l et un rendement de 48 %.
- Le rendement maximum est de 55 % en réacteur de 2 l agité à 800 tr /mn.
- Cette souche présente un métabolisme fermentaire aérobie avec une faible production en ethanol. Elle est sensible à l'effet Pasteur.

D'après les résultats obtenus, il semblerait donc que la souche *Kluyveromyces fragilis*, soit une levure intéressante pour l'épuration des effluents chargés en lactosérum. Toute fois, en vue d'une production de protéines, il nous a semblé utile d'envisager un procédé de production en continu.

2

2. 1. 2. Culture continue

En vue de bien cerner le comportement de la souche *Kluyveromyces fragilis* en culture continue, les cinétiques de production de biomasse, de disparition du lactose et d'apparition d'ethanol ont été étudiées aux taux de dilutions suivants 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.38.h⁻¹

Ces culture sont lancées dans le fermenteur de 2 l, avec les conditions de culture déjà définies. L'oxygène dissous est à 60% de la saturation Les figures 37, 38, 39, 40, 41, 42 et 43. le tableau 20 résumant les résultats obtenus aux différent taux de dilution utilisés.

Tableau 20: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis*

Taux de dilution D (h^{-1})	Biomasse (g/l)	Lactose résiduel (g/l)	Ethanol (mg/l)	Rendement (%)	Productivité ($g/l \cdot h^{-1}$)
0.1	11	0	0.03	55	1.10
0.15	11.5	0	0.08	57	1.72
0.20	12.2	0	0.50	61	2.44
0.25	9.15	4.8	1.50	60	2.28
0.30	5.33	6.7	2.50	40	1.59
0.35	2.53	13.5	4.05	38	0.88
0.38	1.26	16.7	6.01	36	0.13

Nous avons constaté qu'aux faibles taux de dilutions ($D \leq 0,2 h^{-1}$), il y avait une absence totale du lactose résiduel dans le réacteur.

Après 20 à 30 heures de stabilisation de la culture à $D = 0,10 h^{-1}$ et $0,15 h^{-1}$, une quantité très faible d'éthanol est mesurée (0,03 mg/l à 0,08 mg/l). A partir de $D = 0,2 h^{-1}$, la concentration en éthanol commence à augmenter légèrement pour atteindre une valeur de 0,5 mg/l. Le lactose n'est plus totalement métabolisé à partir de $D \geq 0,25 h^{-1}$. La quantité en éthanol produite va en augmentant avec l'élévation du taux de dilution.

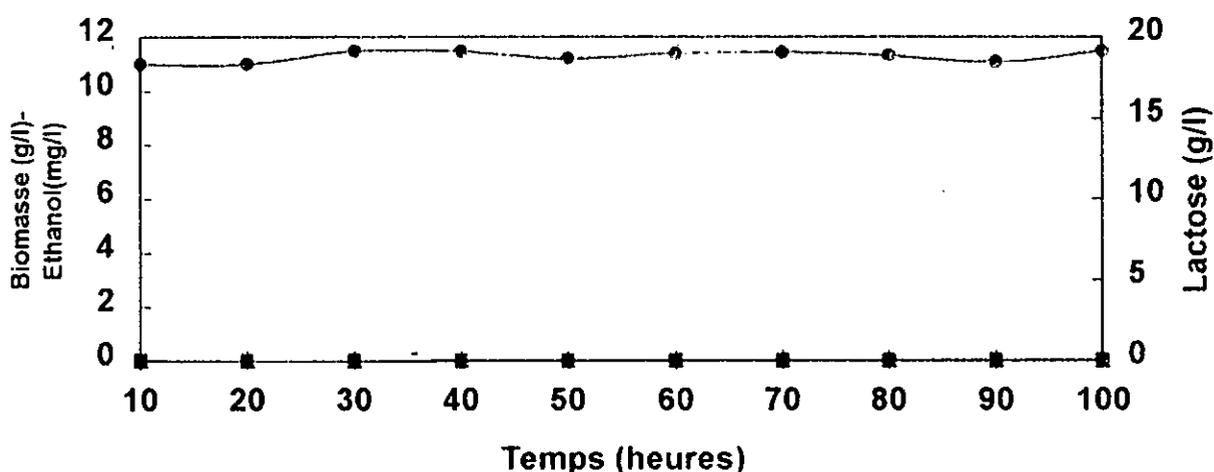


Fig. 37: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,10 h^{-1}$ en fonction du temps.

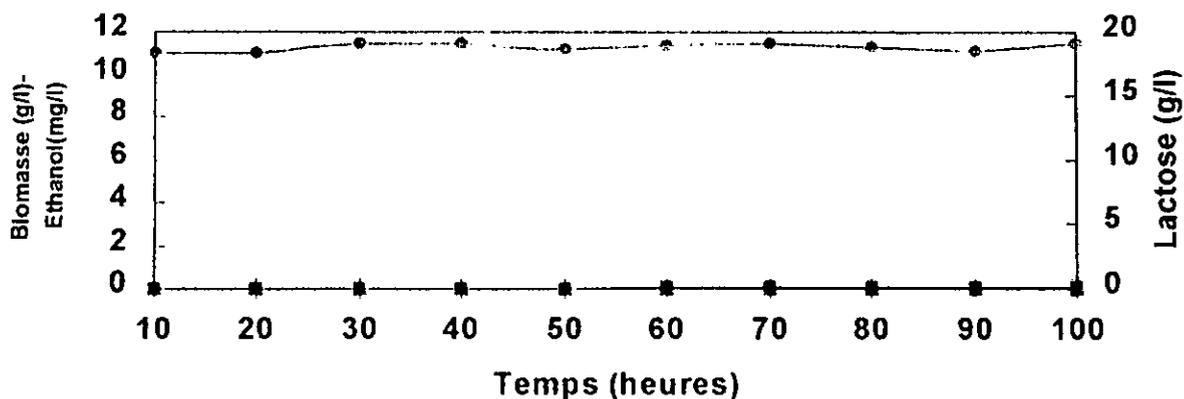


Fig. 38: Culture continue de la souche *Kluveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps

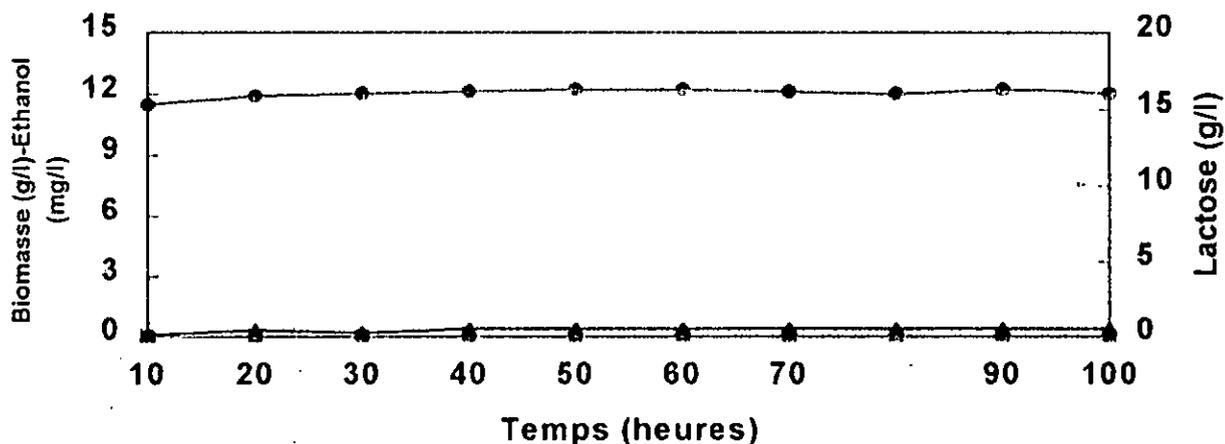


Fig.39: Culture continue de la souche *Kluveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,20 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

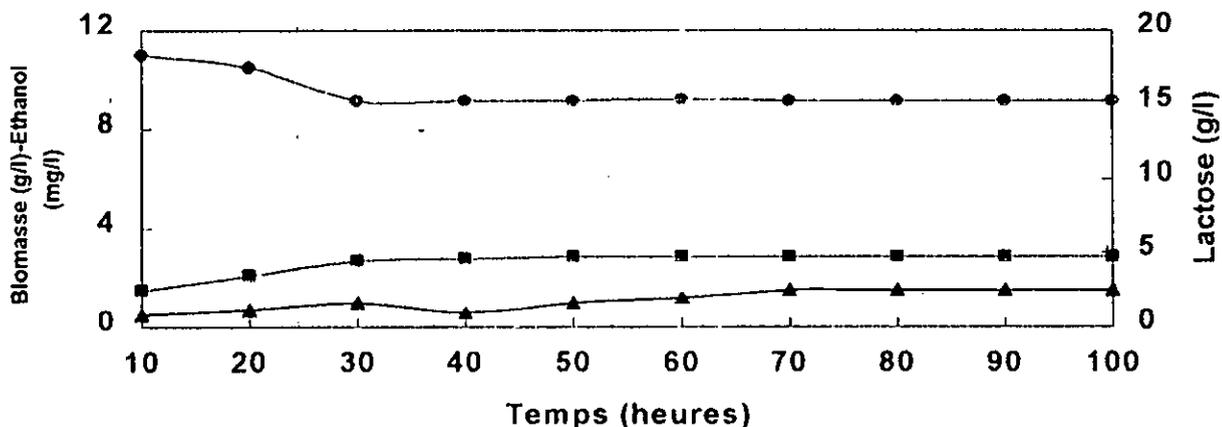


Fig. 40: Culture continue de la souche *Kluveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

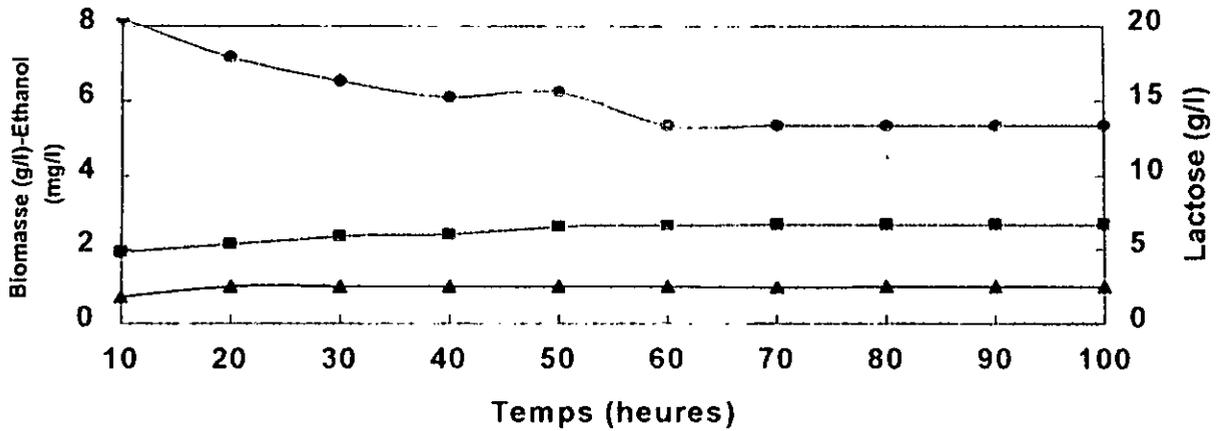


Fig. 41: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'ethanol (—▲—) à $D = 0,30 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

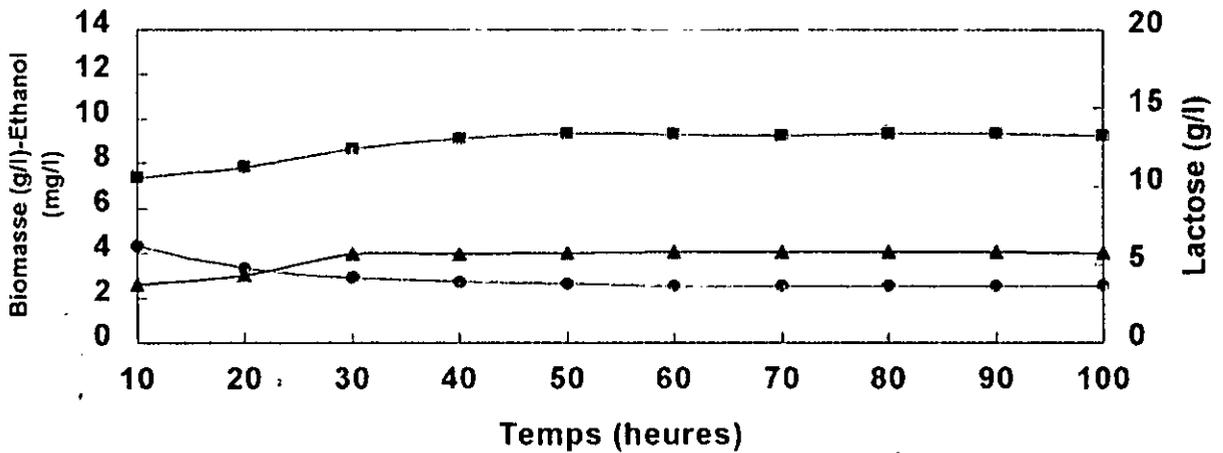


Fig. 42: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,35 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

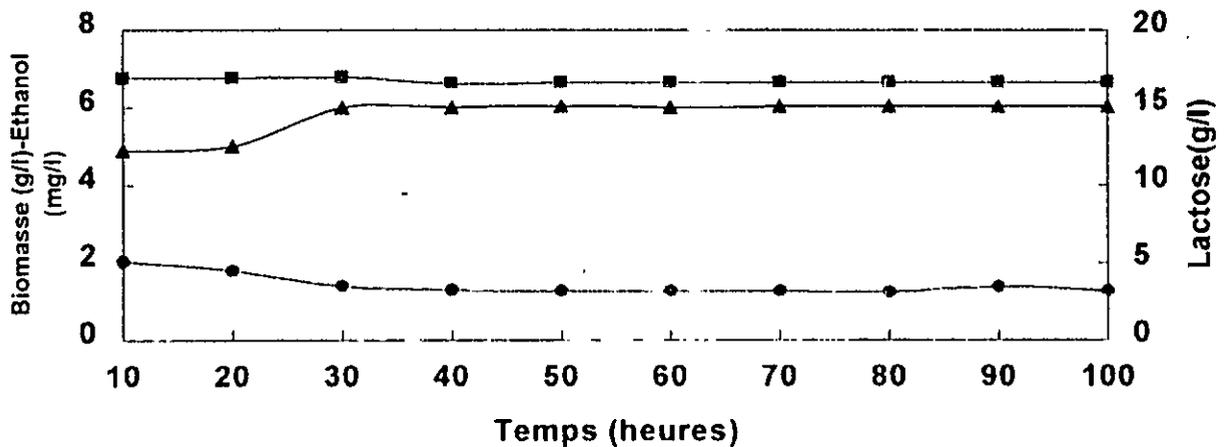


Fig. 43: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), d'éthanol (—▲—) à $D = 0,38 \text{ h}^{-1}$ en fonction du temps.

De plus, la concentration en oxygène dissous reste pratiquement stable. Elle ne devient facteur limitant (estimée autour de 10%) qu'à des taux de dilution élevés et supérieurs ou égales à $0,30 \text{ h}^{-1}$ (Fig. 44). Par ailleurs, on remarque que quand le taux de dilution augmente, il y a un lessivage progressif du fermenteur par diminution de la biomasse et l'augmentation de production d'éthanol. Ceci se traduit par une limitation importante de la vitesse de croissance.

Deux raisons peuvent expliquer ce phénomène. Une déficience dans les éléments nutritifs du milieu (substrat limitant) et une aération insuffisante due à une oxygénation inadéquate (Kallel et al., -1991). En outre, la productivité augmente en fonction du taux de dilution jusqu'à $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$. La productivité optimum obtenue dans cette étude est de $2,44 \text{ g/litre/h}$. Elle est comparable à celle obtenue par Agnes (1986) en utilisant la souche *Candida curvata*. Vananuvat et Kinsella (1975) obtient une productivité de 2 g/litre/h dans les mêmes conditions opératoires à un taux de dilution égale $0,18 \text{ h}^{-1}$.

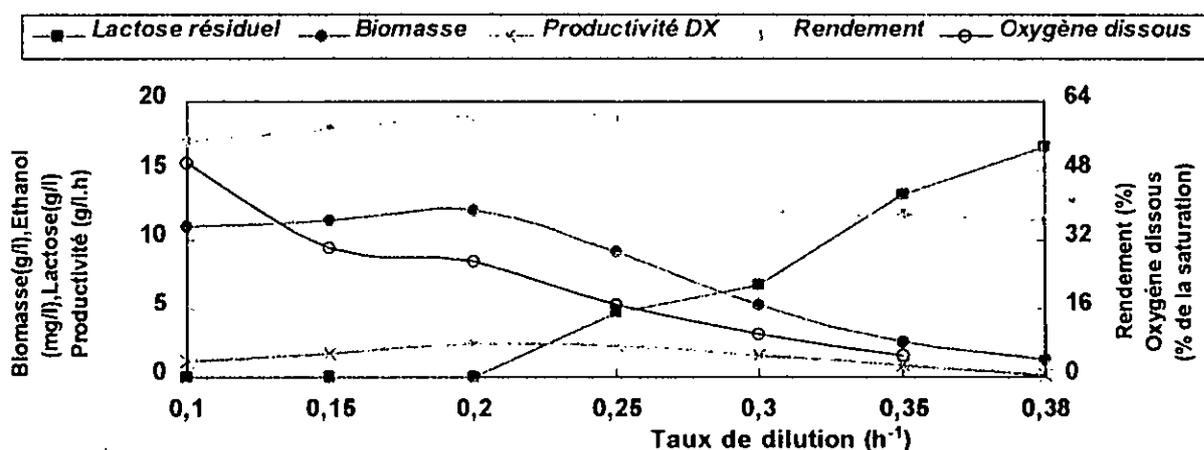


Fig. 44: Culture continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de la biomasse (—●—), du lactose (—■—), de la productivité horaire (—x—), du rendement global (—◆—) et de la saturation en oxygène dissous (—○—) en fonction du taux de dilution.

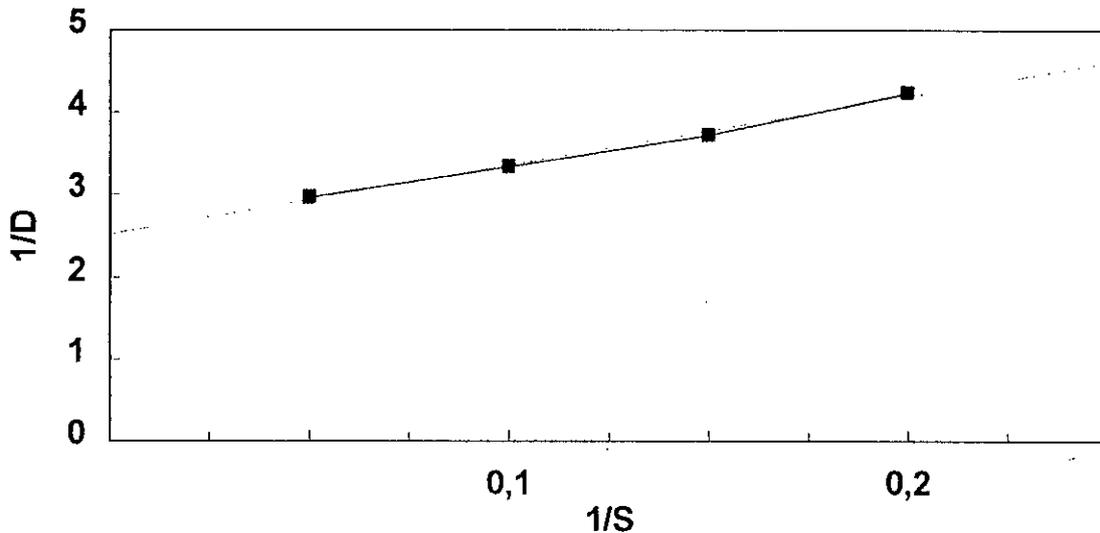
La croissance de *Kluyveromyces fragilis* en culture continue à un taux de dilution $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ sur du lactosérum dilué à 2 % de lactose donne le rendement le plus élevé (61 %). Un rendement légèrement inférieur à celui obtenu par Vananuvat et Kinsella (1975) (72,5 %) à $D = 0,18 \text{ h}^{-1}$. Mais largement supérieur au rendement obtenu par Kallel et al., (1991) (44%) dans les mêmes conditions de culture. On se demande quelle est la concentration du substrat S limitant à l'équilibre dans le bioréacteur.

Soit D le taux de dilution, S_0 la concentration du substrat dans le réservoir, S la concentration en substrat résiduel dans l'effluent (égale à celle du bioréacteur) et X la concentration stationnaire de la population dans le bioréacteur.

$$\text{Comme } \mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

μ_{\max} et le K_s sont déterminés expérimentalement, selon la figure 45. On obtient μ_{\max} égale à $0,45 \text{ h}^{-1}$ et le $K_s = 2,56 \text{ g/l}$. En connaissant ces valeurs, on peut procéder à la détermination par calcul du D optimum et D critique; en prenant pour valeur de $S = 20 \text{ g/l}$. On obtient alors:

$$D_{\text{critique}} = 0,39 \text{ h}^{-1} \quad \text{et} \quad D_{\text{optimum}} = 0,29 \text{ h}^{-1}$$



*Fig. 45: Evolution de 1/D en fonction de 1/S.
Détermination de K_s et du taux de croissance maximum (μ_{\max})*

D'après l'équation de Monod, il est possible de calculer les valeurs du substrat résiduel \tilde{S} à l'équilibre pour les différents taux de dilution en reportant les valeurs de μ_{\max} et de K_s dans l'équation suivante:

$$\tilde{S} = \frac{D \cdot K_s}{\mu_{\max} - D} \quad (\text{si } K_d = 0 : \text{coefficient spécifique de lyse cellulaire}).$$

En utilisant les valeurs expérimentales de S_0 et de R_x , nous pouvons ainsi calculer la valeur de X à l'équilibre en fonction du taux de dilution avec:

$$\tilde{X} = R_x (S_0 - \tilde{S})$$

La valeur de R_x retenue correspond à la moyenne des rendements expérimentaux obtenus, soit 49,7%. De même, la productivité est déduite en connaissant les valeurs de X , selon équation :

$$P = D \cdot \tilde{X}$$

Les valeurs calculées sont représentées dans le tableau 21. Elles sont illustrées dans la figure 46.

Tableau 21: Valeurs calculées de la variation de la biomasse \tilde{X} , du substrat résiduel \tilde{S} et de la productivité horaire en fonction du taux de dilution.

D (h ⁻¹)	\tilde{X} (g/l)	\tilde{S} (g/l)	D \tilde{X} (g/l h)
0.1	9.57	0.73	0.95
0.15	9.3	1.28	1.39
0.20	8.92	2.04	1.78
0.25	8.34	3.2	2.08
0.3	7.39	5.12	2.21
0.35	5.48	8.96	1.92
0.38	3.03	13.89	1.15

Ce qui signifie qu'à l'équilibre la concentration en substrat ne dépend que du taux de dilution. La concentration S_0 dans le milieu frais n'intervenant pas. Comme K_S est faible, la valeur de S est également faible.

Ces données permettent l'établissement des courbes donnant l'évolution de la concentration du substrat à l'équilibre \tilde{S} , de la concentration cellulaire \tilde{X} à l'équilibre et de la productivité horaire $P=D\tilde{X}$ en fonction du taux de dilution (Fig. 46).

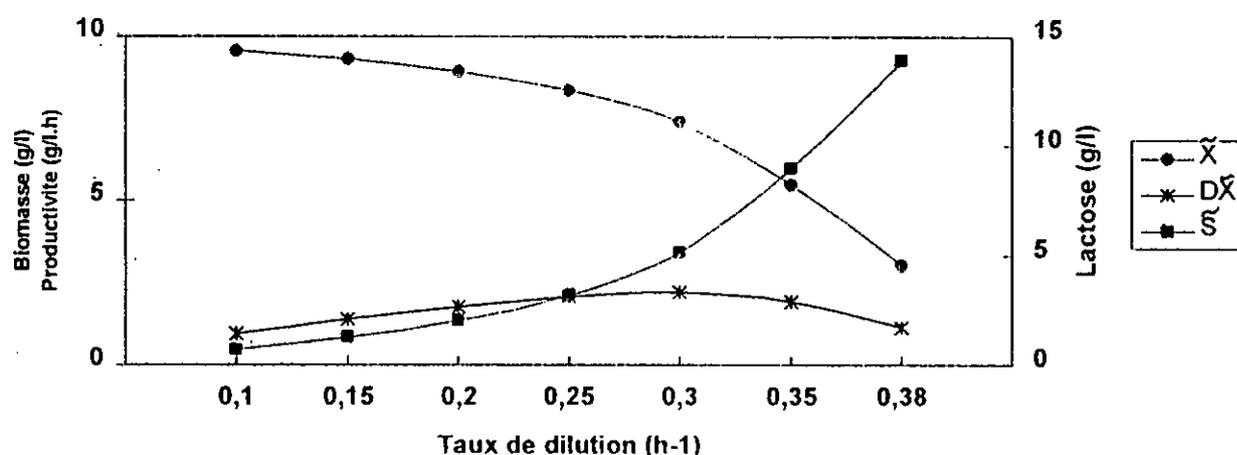


Fig. 46: Estimation de la variation de la biomasse (—◆—) du lactose (—■—) et de productivité horaire (—*—) en fonction du taux de dilution

2. 2. Estimation de la réduction de la pollution du lactosérum par mesure de la DCO

Les valeurs de la demande chimique de l'effluent à l'entrée et à la sortie du fermenteur de 2l en culture discontinu figurent dans le tableau 22 et l'histogramme de la Figure 47. L'effluent est obtenu par élimination des levures par centrifugation.

Tableau 22: Evolution de la DCO en culture discontinue en fonction du temps.

Temps de culture (h)	DCO résiduelle (mg/l)	Abattement de la DCO (%)
0	55000	0
6	35000	36
12	15000	72
18	800	98.5
24	0	100

Ces résultats montrent qu'il y a augmentation de l'efficacité de l'épuration avec l'augmentation du temps de culture. Par exemple, en augmentant le temps de 6 à 24 h, la réduction de l'abattement de la DCO passe de 36 à 100%.

La réduction de la DCO est comparable à celle obtenue par **Vananuvat et Kinsella (1975)** et **Ghaly et Singh (1989)**. Selon **Loehr (1984)**, la diminution de la DCO peut être expliquée par l'utilisation de la matière organique présente dans le milieu par les microorganismes. Cette matière répond aux besoins en énergie nécessaire aux réactions de biosynthèse cellulaires en présence d'oxygène.

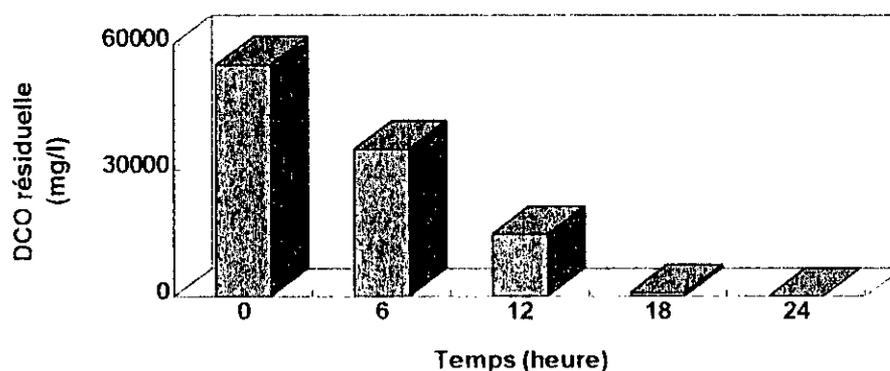


Fig. 47: Evolution de la DCO en culture discontinu de la souche *Kluyveromyces fragilis* en fonction du temps

En culture continue, nous avons étudié l'influence du taux de dilution sur l'efficacité de l'épuration par mesure de la DCO résiduelle.

L'histogramme de la Figure 48 montre que la DCO résiduelle, ainsi que son abattement dépendent fortement du taux de dilution. L'épuration de l'effluent est complète à des taux de dilution inférieurs à $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$. Au delà de ce taux, on assiste à une réduction de l'abattement et par conséquent de l'augmentation de la DCO résiduelle. Par ailleurs, elle reste élevée dans l'effluent obtenue en culture continue à $D = 0,38 \text{ h}^{-1}$, du moment qu'on assiste à un lessivage progressif de la culture.

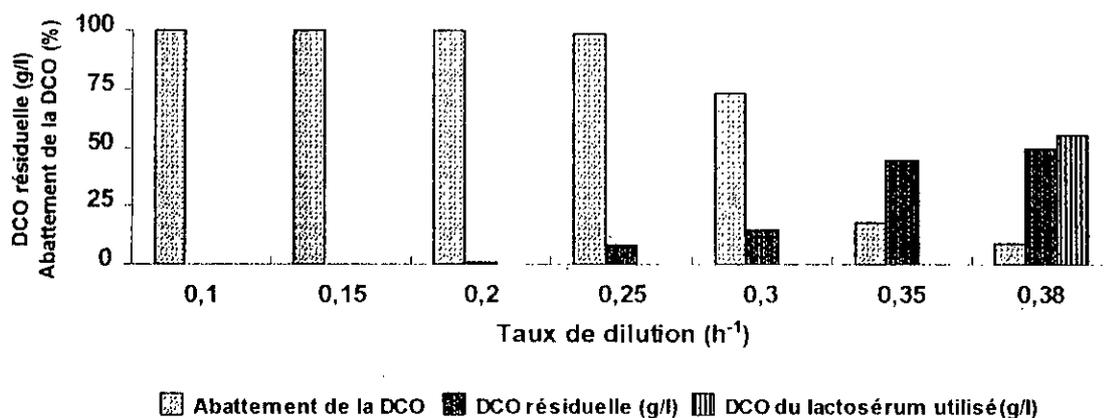


Fig. 48: Evolution de la DCO résiduelle et de l'abattement de la DCO en culture continue et en fonction du taux de dilution.

Agnes (1986) met en évidence le même comportement de *Candida curvata* à différent taux de dilution. De même, Ghaly et Singh (1989) utilisent des taux de dilution relativement faibles (inférieur à 0,2 h⁻¹) afin d'arriver à une meilleure épuration de l'effluent. Et par conséquent de réduire potentiellement la pollution provoquée par le rejet du lactosérum dans les eaux résiduaires.

On peut déduire donc que l'épuration totale du lactosérum est possible par fermentation continue et discontinue.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'objectif de cette étude est de voir si la culture de levures locales sur lactosérum, pourrait permettre d'obtenir l'élimination totale du lactose de l'effluent tout en produisant une quantité importante de biomasse.

Nous avons entamé notre étude par l'isolement de dix souches de levures différentes appartenant à trois genres distincts, *Kluyveromyces*, *Candida* et *Schizosaccharomyces*.

Ces levures sont obtenues à partir de produits laitiers différents, par ailleurs, nous avons mis en évidence la présence de levures du genre *Schizosaccharomyces* dans le lait de vache cru et dans les fromages à pâte cuite, cette présence n'a jamais été signalée auparavant. Ce qui nous laisse penser que ces levures peuvent se développer dans un autre biotope naturel qui est le lait autre que les mélasses de canne à sucre et autres produits alimentaires sucrés signalés par Lodder (1971).

L'étude de la cinétique de croissance des levures sélectionnées du genre *Kluyveromyces* et *Candida* dans un milieu de culture à base de lactose permet de mettre en évidence les performances de la souche de levure du genre *Kluyveromyces fragilis* et de la distinguer parmi les autres levures par sa capacité à métaboliser le lactose.

Bien que *Candida Kefyr 2* présentait des caractéristiques intéressantes pour la production de biomasse sur lactose, on a vu que son temps de culture relativement élevé, ne permettait pas d'atteindre les objectifs que l'on s'était fixé, ce qui nous a conduit à retenir la souche de levure locale *Kluyveromyces fragilis*, toute fois, il est à signaler que *Kluyveromyces fragilis* est une levure très utilisée pour la production industrielle de protéines d'organismes unicellulaires sur perméat de lactosérum.

Par ailleurs en culture discontinue, nous avons constaté que la souche de levure *K. fragilis* était capable d'assimiler complètement le lactose présent dans le milieu avec des temps de culture courts. Les résultats de notre étude à côté de ceux déjà obtenus par d'autres auteurs, nous montrent que l'on peut obtenir des p o u avec un extrait sec de 10 à 14.5 g/l avec une teneur protéique de 50 %. Les résultats sont comparables et parfois meilleurs à ceux obtenus par d'autres auteurs comme Bayer (1983), Kallel et al., (1991) et Touzi et al., (1991).

L'étude de l'influence de la température et du pH, nous permet de conclure que la température de 30 °C semble être la mieux appropriée pour l'obtention d'un meilleur rendement en biomasse, il est de même pour le pH, la souche *Kluyveromyces fragilis* présente un pH optimum de 4.5, cette souche est donc mésophile et légèrement acidophile.

Il faut noter que ces deux critères sont importants à prendre en considération dans la mesure où l'on souhaite produire des p o u, en utilisant un lactosérum non stérilisé à pH acide, la croissance de la microflore endogène du lactosérum est alors inhibée.

Au cours, des expérimentations sur le réacteur de 2 litres, à une vitesse d'agitation réduite, permettant de rendre les conditions d'oxygénations limitantes, la production d'éthanol a été favorisée au détriment de celle de la biomasse, la souche étudiée semble donc être légèrement sensible à l'effet Pasteur.

Ce phénomène métabolique fréquemment rencontré chez les levures est souvent appelé fermentation « aérobie », elle s'explique par l'existence de limitations intervenant au niveau de la voie respiratoire, l'acide pyruvique en excès, ne pouvant être métabolisé par la voie du cycle de Krebs, l'est par la voie éthanolique.

Les limitations de la voie respiratoires peuvent avoir deux origines qui sont, soit des conditions limitantes en oxygène qui empêchent la voie respiratoire de fonctionner au maximum de ces capacités, soit des caractéristiques métaboliques propres à la souche, on parle alors d'effet Crabtree (ou répression catabolique) qui se caractérise par l'inhibition des enzymes de la respiration (ou de la synthèse des cytochromes) due à un excès de sucre dans le milieu (Agnes 1986).

En ce qui concerne la souche *Kluyveromyces fragilis*, il est important de souligner que toutes nos expériences s'étant déroulées dans des conditions d'oxygénation supérieures à 30 % de la saturation, voire même à 100 %, on peut penser que le seuil critique d'inhibition estimé par la plupart des auteurs à 10 % de la saturation n'était pas atteint.

Dans ces conditions l'effet Crabtree pourrait expliquer l'existence du métabolisme fermentaire, mais ce phénomène se manifeste généralement par une synthèse maximale d'éthanol en tout début de croissance (Agnes 1986).

Or ici l'éthanol n'apparaît qu'en fin de culture, on est donc amené en définitive à penser à une capacité un peu limitée de la voie respiratoire de la souche *Kluyveromyces fragilis*, quand celle-ci est cultivée dans les conditions d'agitation réduites, limitant ainsi les performances du transfert oxygène.

Par ailleurs, en accord avec les présents résultats, dans presque tous les travaux consultés, une concentration en lactose de 10 à 20 g/l est considérée comme optimale pour l'obtention d'un bon rendement en biomasse, donc la dilution du lactosérum semble importante.

Toute fois, il est à noter que l'épuration totale du lactosérum par culture discontinue ou continue de la souche *Kluyveromyces fragilis* est possible.

En culture continue des taux de dilution inférieurs à 0.2 h^{-1} permettent de trouver le meilleur compromis entre une dépollution maximum (lactose résiduel et DCO $\cong 0$) est une productivité élevée 2.44 g / l / h , le rendement en biomasse est alors de 61 %.

Globalement, les résultats obtenus sont satisfaisants, la souche de levure *Kluyveromyces fragilis* isolée à partir du lactosérum semble avoir toutes les qualités requises d'une levure aliment, il serait intéressant dans un avenir proche d'envisager la mise en route d'un fermenteur pilote, ainsi que l'examen des qualités nutritionnelle de la biomasse produite.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) **Alais C, (1985).**
Science du lait, principes ed Sepaic 815 ,7.
- (2) **Agnes N, (1986).**
Production des protéines à partir de lactosérum brut. Thèse de 3^{ème} cycle Université de Lyon.
- (3) **Addouche R & Ghouilem D, (1995).**
Isolement et identification des levures à partir des produits laitiers et optimisation de la croissance de *Kluyvomyces fragilis* sur lactosérum en vue de la production de biomasse. Mémoire D. E. S, I.S.N - université USTHB.
- (4) **Atiskon B, Mavituna F, (1983).**
Biochemical engineering and biotechnology handbook. Nature Press. p 1119.
- (5) **Beuchat L. R & Deak T, (1987).**
Identification of food yeast. Journal of food protection, vol. 50, n°3.
- (6) **Biroulaud P, (1971).**
Quelques données sur l'intérêt nutritifs de la levure aliment et de son industrie. Revue de l'institut Pasteur, Lyon, T₄, n° 2.
- (7) **Biroulaud P & Vrignaud Y, (1982).**
Levurerie, périodique n° 11 ed industries alimentaires et agricoles.
- (8) **Barnett J. A, Payne R. W & Yarrow D, (1979).**
A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge University Press Cambridge.
- (9) **Barnett J. A & Pankhurst R. J, (1974).**
A new key to the yeasts, 434 species are approved by the C.B.S. Ed. American Elsevier publishing campagny.
- (10) **Boudier J. F & Luquet F. M, (1980).**
Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires APRIA N° 21.
- (11) **Bouix M & Leveau J. Y, (1980).**
Méthodes utilisées en différenciation et classification des levures. Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires APRIA N° 24.
- (12) **Bargain V, 1993**
Procédé Compal :Produire des levures à partir du lactosérum. Process 62 n° 1083.
- (13) **Bourgeois C. M & Leveau J. Y, 1980.**
Techniques d'analyses et de contrôles dans les industries alimentaires, vol. 3 ed techniques et documentation. Lavoisier Paris.

(14) Bel Industrie (1997).

Protibel: Matière première et activateur de croissance pour la fermentation. Brochure interne, brochure commerciale du protibel.

(15) Bayer K & Meyrath M, (1979).

Feed yeast production from whey. Congrès international de microbiologie et des industries alimentaires, Paris, pp 91-101.

(16) Bassila I, (1980).

Etude comparée de quelques souches de levures en vue de leur culture sur du lactosérum. Thèse 3^{ème} cycle université de Lyon.

(17) Bayer K, (1983).

Trace élément supplémentation of cheese whey for the production of feed yeast. J Dairy Sci . 66 , 214 - 220.

(18) Cooper C. M, Fernstrom G. A & Miller S. A, (1944).

Performance of agitated gas - liquid contractors. Ind - Eng - Chem . 36 : pp504-509.

(19) Corrieu G, Lalande M & Peringer P, (1975).

Determination du coefficient du transfert d'oxygène dans un fermenteur à partir du bilan gazeux d'une culture microbienne. Rev , Ferm . Ind . Alim . 30 , N° 5 , pp125-131 .

(20) Castrillo J. I, Kaliterna J. W, Weusthuis R. A, Van Dijken J. P & Pronk J. T, (1996).

High cell. density cultivation of disaccharides in oxygen limited batch cultures. Biotechnology and bioengineering vol. 49, pp 621 -628.

(21) Crippen K. L & Jeon J. J, (1983).

Direct acid set cottage cheese whey as a base for a shelf stable athletic - type drink. Journal Food protection, 47 53-57.

(22) Camilleri C, Jover J. P, De Pierreau A & Meyer E, 1986.

Un procédé performant pour la valorisation énergétique du perméat de lactosérum. Industries Alimentaires et Agricoles Mai 1986.

(23) Dubois M. K. S, Gilles J. K & Hamilton P. A, (1956).

Colorometric method for determination of sugar and related substances. Anal. And chem. Jour. 28: 350.

(24) De La Guerivière J. F, (1981) (c).

Un exemple concret en matière de biotechnologie. La production et la valorisation des levures lactiques. Les levures lactiques cultivées sur lactosérum déprotéiné. Tech. lait 952, pp 89 -92.

(25) De la Guerivière J. F, (1981) (a).

Utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine traditionnelle et produits de cuisson céréaliers. Tech. Lait, 952, 57, 95.

(26) De la Guerivière J. F, (1981) (b).

Les levures lactiques cultivées sur lactosérum déprotéiné. Tech. Lait, 952, 89, 92.

(27) Davenport R. R, (1980).

An introduction to yeasts and yeast like organisms in Skinner F. A, Passmore S. M et Davenport R. R. Biology and activities of yeasts. Academic press pp 1-23.

(28) Damiano D, Shin C. S, Ju N. H & Wang S. S, (1985).

Performance, kinetics and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membrane. Applied microbiology biotechnology . (21) pp 69-77.

(29) El Samragy Y. A & Zall R. R, (1988)

The influence of sodium chloride on the activity of yeast in the production of single cell protein in whey permeate. Jour. Dairy sci 71 :pp 1135- 1140.

(30) Euzen J. P, 1980.

Performances de fermenteurs gazosiphons. Colloque Soc.Fr.Microbiol Toulouse p.71-96.

(31) Fiedurek J & Szczodrak J, (1994)

Selection of strain, culture conditions and extraction procedures for optimum production of β galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Acta microbiologica polonica vol 43, N° 1 pp 57, 65.

(32) Fleury M & Henriet M, (1977).

Traitement du lactosérum par le procédé Caliqua / Sireb. In Colloque APRIA / DGRST: les lactosérums une richesse alimentaire , 17-18 novembre Paris pp 108-123.

(33) Foda M, (1976).

A novel approach for whey utilisation in production of native and microbial protein milchwissenschaft; 31 n°3 p (138-140) (C.D.I.U.P.A, n° 92 954).

(34) Guiraud J & Galzy P, (1980).

Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed l'usine nouvelle, Paris pp 240.

(35) Gourseaud J, (1986).

Biotransformation du lactose. Industries alimentaires et Agricoles Mai 1986.

(36) Ghaly A. E & Singh R. K, (1989).

Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. Art biochemistry and biotechnology , vol. 22 pp 220 -228.

(37) Ghaly A. E & El- Taweel A. A, (1995).

Effect of lactose concentration on batch production of ethanol from cheese whey using *candida pseudotropicalis*. ASAE paper vol 38 (4) pp 1113 - 1120.

(38) **Gazly P & Guiraud J, (1980).**

Technique taxonomiques, analyse des principaux constituants cellulaires dans les techniques d'études des champignons levuriformes. Bio vol 8 n° 4.

(39) **Gianetto A, Berrut F, Glick B. R & Kempton A. G, (1986).**

The production of ethanol from lactose in a tubular reactor by immobilized cells of *Kluyveromyces fragilis*. Applied microbiol and Biotechnol.24 (2) pp 277-281.

(40) **Hellal Z, (1983).**

Isolement et caractérisation des souches de levures en vue de la production de protéines sur lactosérum. Thèse d'ingénieur, Institut National d'Agronomie (I. N. A) -Alger.

(41) **INAPI (1993).**

Catalogue Normes Algériennes, Institut Algérien de Normalisation et de propriété industrielle.

(42) **Janssens J. H, Bernard R & Bailey B, (1984).**

Ethanol from whey continous fermentation with cell recycle. Biotechnology and bioengineering , Vol. XXVI, pp 1 -5.

(43) **Jostrom G & Hakansson E, 1953.**

Production of riboflavin in whey by *Ereniothecium ashbyii*. In :Congrès international de laiterie 13, La Haye vol II, sect II, La Haye, Mouton et Co, p. 697-700.

(44) **Kallel H, Garrido Sanchez L, Engasser J. M & Micro A (1991).**

Optimisation d'une culture continue de *Kluyveromyces fragilis* sur un ultrafiltrat de lactosérum. influence de minéraux et de vitamines sur la croissance et le métabolisme de la levure. Microbiologie - Aliment -Nutrition , vol 9 ,pp 309-317.

(45) **King V. A. E & Zall R. R, (1983).**

Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeast . Process Biochem.18:17.

(46) **Kisaalita W. S, Pinder K. L & Lo K. Y, (1987).**

Acidogenie fermentation of lactose. Biotechnology and bioengineering Vol 30 n°1 .

(47) **Kurztman C. P, (1990-).**

Classification and general properties of yeasts. In Verachtert H et De Mot R, Yeast biotechnology and biocatalysis, Dekker eds. N. Y, pp 1-34.

(48) **Ladet J, Moulin G, Galzy P, Joux J & Biju-Duval F, (1972).**

Comparaison de rendements de croissance sur lactose de quelques *kluyveromyces* Van der walt. Le lait, 52, n° 519 - 520 pp 613 - 621.

(49) **Lodder J, (1971).**

The yeast taxonomic study. North Holland publishing company , Amsterdam, London.

(50) Loehr R. C, (1984).

Pollution control for agriculture academic press. In: Ghaly A. E. & Singh R. K. (1989). Art biochemistry and biotechnology , vol. 22 pp 220 -228.

(51) Mann E, (1984).

L'utilisation des produits laitiers en boulangerie pâtisserie. Rev. Lait fr, 432, pp 31-34.

(52) Moulin G, Malige B & Galzy P, (1981).

Etudes physiologiques de *Kluyveromyces fragilis*, conséquence pour la production de levures sur lactosérum; Le lait Juillet - Août 1977 n° 607, pp323- 332.

(53) Moulin G, Varchon P & Galzy P, (1977).

Une nouvelle utilisation possible du lactosérum: La préparation de boisson à base de galactose Ind .Alim Agric .94, pp 210-215.

(54) Mahmoud M. M & Kosikowski F. V, (1982).

Alcohol and single cell protein production by *kluyveromyces* in concentrated whey permeates with reduced ash. Journal of dairy science vol 65 N° 11.

(55) Moon K. J & Hammond E. G, (1978).

Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protéine. J Dairy Sci , 61, pp 1537-1547.

(56) Moon K. J, Hammond E. G & Glatz B, (1977).

COD reduction of whey and whey ultrafiltrate by fermentation to yeast oil. In: American Dairy Science Association, 72 nd. Annual meeting Ames (IOWA) ADSA meeting and divisional abstracts. Journal of dairy science 6, supplement I, pp 41.

(57) Marwaha S. S & Kennedy J. F, (1983).

Vitamine B₁₂ production from whey and simulation of optimal cultural conditions. Process. Biochem, 18, pp 24- 27.

(58) Moukil B, (1988).

Identification de deux souches de levures isolées de la melasse et de leur aptitude à la fermentation Thèse INA Alger.

(59) Nagashima M, (1990).

Progress in ethanol production with yeasts. In Verachtert H, De Mot R, Yeast biotechnology and biocatalysis, Dekker eds. N. Y, pp 57-87.

(60) Osovik A, Gridina L, Marinchenko A & Bashirova R, (1975).

Culture de la levure *Trichosporon cutaneum* K. 1 sur du lactosérum. Prikladnaja Biokhimija i mikrobiologija/1; n° 3 pp 473 - 476.

(61) Phaff H. J, Miller N. W & Mrak E. M, (1978).

Ecology in the life of yeasts, pp 183, 223, Harvard university press, combridge, London.

(62) Pinel M, (1981).

L'utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine traditionnelle. Produits des charcuteries de salaison et conserves de viande. Tech lait, 952, 61-63.

(63) Remond B, Coulon J. B, (1986).

Digestion du lactosérum dans le rumen chez les vaches laitières, Repro Nutr Develop 26 (1B) pp311-312.

(64) Rosner R. G,-1982.

Opération rhônes alpes de valorisation de sous-produits de l'agro-alimentaires par alimentation animale. 2ème rapport, la recherche 188, 586 - 801.

(65) Roger L, Brule G & Mauboin J. L , (1981).

Nouvelles voies de valorisation des proteines lactosériques. Hydrolyse des proteines du lactosérum, intérêt thérapeutique. Tech lait 952, 65-67.

(66) Schmidt J. L & Baroiller C, (1984).

Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures présentes dans les fromages. Rev. Le lait n°64, pp 16 -28.

(67) Schmidt J. L & Lenoir J, (1980).

Contribution à l'étude de la flore de levure du fromage de Camembert. Rev. Le lait, pp 272-282, 595- 596.

(68) Shay L. K & Wegner.G. H (1985).

Nonpolluting conversion of whey permeate to food yeast protein. J Dairy . Sci 69 ,pp 676-683.

(69) Sriban R, (1993).

Biotechnologies. 4^{ème} ed, Technique et documentation, Lavoisier p 590.

(70) Sandhu D. K & Waraich M.K, (1983).

Conversion of cheese whey to single cell protein. Biotechnology bioeng., 25, pp 797, 808.

(71) Towler C, (1982).

Utilisation of whey protein products in Pasta N Z J .Dairy sci, Technol, 17, pp 229-236.

(72) Touzi A., Boukerdenna W, Temal M. Gaid A, (1991).

Production de protéines d'organismes unicellulaires à partir du lactosérum avec *Kluyveromyces fragilis*. Rapport HCR , CDTN.

(73) Trystram G, Guenneugues P, Pigache S, Brenon M & Bimbenet J. J, (1991).

Optimisation du procédé industriel de fermentation continu de levures sur lactosérum. Industrie Alimentaire et Agricole Vol n° 108 p. 799-810.

(74) Vienne P & Von Stockar V, (1985).

An investigation of ethanol inhibition and other limitations occurring during the fermentation of concentrated whey permeate. *Biotechnol. Letters* 7 (7) pp 521- 526.

(75) Verachtert H & De Mot R, (1990)

Yeast biotechnology and biocatalysis. Dekker eds. N. Y, pp 300.

(76) Vananuvat P & Kinsella J, (1975).

Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*, Batch culture studies. *Journal of food science* vol 40 pp 330-341.

(77) Vrignaud Y, (1971).

Levures lactiques. *Rev. Inst. Past. Lyon*, 4: pp 147 -165.

(78) Wareserman A. E, Hopkins W. J & Porges N, (1958).

Whey utilisation growth conditions for *Saccharomyces fragilis*. *Sewage industrial wastes*, 30, 912.

(79) Wasserman A. E, (1960).

The rapid conversion of whey to yeast; *Dairy eng* 77 : pp 274.

(80) Wasserman A. E, Hampson J, Alvare N. F & Alvare N. J (1961).

Whey utilization growth of *Saccharomyces fragilis* in whey in a pilot plant. *Jour. Dairy Sci* :44, pp 387 -392.

(81)Welsh F. W, Veliky I. A (1984).

Production of acetone- butanol from acid whey . *Biotechnol . lett* ,pp 61- 64.

(82) Willetts A & Ugalde U (1987)

The production of single cell protein from whey. *Biotechnology letters* Vol 9 n°11 pp 795-800.

ANNEXES

Composition des milieux de culture et réactifs utilisés pour l'isolement des levures.

1. Milieu d'enrichissement (Moukil -1988)

	Milieu liquide (E ₁)	Milieu solide (E ₂)
- Extrait de levure.....	5g.....	5 g
- Lactose.....	20 g.....	20 g
- Agar.....	/.....	20 g
- Oxytétracycline.....	0,1.....	0,1 g
- Eau distillée.....	1000 ml.....	1000 ml
- pH.....	4,5.....	4,5

2. Milieu de purification (Moukil -1988)

	Milieu liquide (P1)	Milieu solide (P2)
- Extrait de levure.....	20 g.....	20 g
- Lactose.....	10 g.....	10 g
- Agar.....	/.....	20 g
- HPO ₄ à 20%.....	5 ml.....	5 ml
- MgSO ₄ à 20%.....	5 ml.....	5 ml
- Eau distillée..... (q s p).....	1000 ml.....	(q s p) 1000 ml
- pH.....	4,5.....	4,5

3. Milieu Sabouraud

- Extrait de levure.....	3 g
- Glucose.....	20 g
- Peptone.....	10 g
- Agar.....	20 g
- Eau distillée (q s p).....	1000 ml
pH	4,5

Composition des milieux de culture utilisés pour l'identification des levures.

1. Milieu de croissance sur milieu solide

- Glucose.....	20 g
- Extrait de levure.....	10 g
- Peptone.....	5 g
- Eau distillée (q s p).....	1000 ml
- Agar.....	20 g

2. Milieu de croissance sur milieu liquide

- Glucose.....20 g
- Extrait de levure.....10 g
- Peptone.....5 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml

3. Milieu de culture pour la filamentation (P. D. A)

- Extrait de pomme de terre.....4 g
- Glucose.....20 g
- Agar.....16 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml
- pH.....5

4. Milieu de culture pour la présporulation

- Extrait de levure.....5 g
- Glucose.....20 g
- Peptone.....3 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml

5. Milieux de culture pour la sporulation

5. 1, Milieu de culture de Fowell

- Acétate de sodium.....5 g
- KCl.....10 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml
- pH.....5,5

5. 2. Milieu de culture de Gorodkova

- Glucose.....1 g
- Peptone.....10 g
- NaCl.....5 g
- Craie.....10 g
- Agar.....20 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml

5. 3. Milieu de culture de Mac Clay

- Glucose..... 1 g
- Extrait de levure..... 2,5 g
- Acétate de sodium..... 8,2 g
- KCl..... 1,8 g
- Agar..... 20 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml

5.4. Milieu de culture à l'extrait de malt

- Extrait de malt..... 20 g
- Agar..... 20 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml

6. Milieu pour la fermentation des sucres (Milieu Wickerham)

- Extrait de levure..... 10 g
- Peptone 5 g
- bleu de bromothymol..... 0,005 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml
- pH..... 4,5

7. Milieu pour l'assimilation des sucres

- Sulfate d'ammonium..... 5 g
- Dehydrogénophosphate de potassium..... 1 g
- Sulfate de magnésium..... 0,5 g
- Agar..... 20 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml

8. Milieu pour l'assimilation des nitrates

- glucose..... 20 g
- Déhydrogénophosphate de potassium..... 0,5 g
- Sulfate de magnésium..... 20 g
- Nitrate de sodium..... 7,8 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml

9. Milieu pour l'étude de l'osmophilie

- Extrait de levure..... 5 g
- Glucose..... 500 g
- Eau distillée (q s p)..... 1000 ml

10. Milieu pour l'hydrolyse de la gélatine

- Extrait de malt.....100 g
- Gélatine.....120 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml

11. Milieu pour l'hydrolyse de l'urée (milieu Christensens- urea- agar)

- Peptone.....1 g
- Glucose.....1 g
- NaCl.....5 g
- Phosphate monopotassique.....3 g
- Rouge de phénol.....2 gouttes
- Eau distillée. (q s p).....1000 ml
- pH.....4,5

12. Milieu Sabouraud à l'actidione

- Glucose.....20 g
- Peptone.....10 g
- Agar.....20 g
- actidione1 g
- Eau distillée (q s p).....1000 ml
- pH 4

13. Réactifs pour la recherche de la nitrate réductase 1 et 2

- Solution d'acide acétique 5 M
 - Acide acétique glacial.....28,75 ml
 - Eau distillée.....71,25 ml

- Réactifs à l'alpha - naphthol
 - Alpha- naphthol.....19 ml
 - Acide acétique.....200 ml
- Eau distillée (q s p).....1000 ml