

9/90

وزارة التعليم العالي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
المكتبة - BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

2EX

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT

S U J E T

“Vérification du modèle de
MONOD sur une culture mixte
pour une bio-production de
protéines sur Lactoserum.”

Proposé par :

Mme MAMERI

Etudié par :

Mlle KOUTAI *Nadia*

Dirigé par :

Mme MAMERI

JURY :

Président :.....Mme BOUSSAID

Promoteur :.....Mme MAMERI

Co-promoteur :.....Mr MAHMOUDI

Examineurs :.....Mme ABDI

.....Mme KELLOU

PROMOTION : JUIN 1990

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT

SUJET

“Vérification du modèle de
MONOD sur une culture mixte
pour une bio-production de
protéines sur Lactoserum.”

Proposé par :

Mme MAMERI

Etudié par :

Mlle KOUTAI

Dirigé par :

Mme MAMERI

JURY :

Président :.....Mme BOUSSAID

Promoteur :.....Mme MAMERI

Co-promoteur :.....Mr MAHMOUDI

Examineurs :.....Mme ABDI
.....Mme KELLOU

PROMOTION : JUIN 1990

B E D I C A C E S

A la mémoire de mon défunt père,
A ma mère qui m'a toujours soutenue,
A mes frères et soeurs,
A tous mes amis (es) .

REMERCIEMENTS

Dans le cadre de l'accomplissement du mémoire de fin d'étude d'ingénieur en Génie de l'environnement au sein de l'école nationale polytechnique d'Alger sous la direction de madame MAMERI, nous tenons à remercier vivement:

- Madame MAMERI, pour son fructueux encadrement,
- Monsieur MAHMOUDI, pour ses précieux conseils,
- Madame BOUSSAID, de bien vouloir présider mon mémoire,
- Madame ABDI, ainsi que Madame KELLOU, pour avoir honoré de leur présence la séance en tant que membres du jury,
- Tout le personnel du Génie de l'environnement,

Tout comme nous tenons à remercier, tous ceux ou celles qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.

S U J E T / Vérification du modèle de MONOD sur culture mixte pour une bioproduction de protéines à partir du lactosérum.

المدرسة الوطنية للعلوم التطبيقية
المكتبة - BIBLIOTHEQUE
Ecole Nationale Polytechnique

R E S U M E : Parmi les nouvelles sources alimentaires actuellement développées, les protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U) occupent une place prééminente.

Notre étude a pour but d'optimiser et de modéliser la croissance cellulaire afin d'obtenir un meilleur rendement en protéines pour une culture mixte.

S U B J E C T / Verification of MONOD's model for bioproduction of proteins from whey.

S U M M A R Y : Among the novel food sources presently being developed and studied, Single-Cell Protein (S.C.P) from yeast holds a prominent role.

This study has of object to optimis cellular growth in order to obtain higher rate of protein .

الموضوع : تطبيق نموذج "مونود" على النمو الخلوي وسمو هذا الأخير أثناء إنتاج البروتينات .

الملخص : تحتل البروتينات المنتجة من الأجسام المنفردة الخلايا مكانة تعتبر استراتيجية في مجال المصادر الغذائية .

موضوعنا هذا ، يهدف إلى :

- الوصول إلى النقطة المثلى في النمو الخلوي

- تطبيق نموذج "مونود" على النمو الخلوي .

- الوصول إلى أقصى مردودية في إنتاج البروتينات .

S O M M A I R E

1	INTRODUCTION	1
2	BIBLIOGRAPHIE ET PARTIE THEORIQUE	3
21	- Acides aminés	4
211	- Propriétés générales	4
2111	Structure générale	
2112	Différents types d'acides aminés	
212	- Classifications	4
2121	En fonction des groupements fonctionnels	
2122	En fonction des propriétés chimiques de R	
213	- Propriétés chimiques	5
2131	Equilibre protonique	
2132	Calcul du pI	
22	- Proteines	10
221	- Définition	10
222	- Structure générale	10
223	- Niveaux d'organisation	10
2231	Structure primaire	
2232	Structure secondaire	
2233	Structure tertiaire	
2234	Structure quaternaire	
224	- Propriétés physico-chimiques	13
2241	Poids moléculaire	
2242	Solubilité	
2243	Propriétés électrolytiques	
23	- Levures	15
231	Historique	15
232	Définition	15
233	CLASSIFICATION	15 et 16
2331	Critères de classification	
2332	Classification	
234	Morphologie - Composition structurale	17
2341	Dimension - forme	
2342	Structure cellulaire	
235	Composition chimique	19
	Levures	21

236	Levures lactiques	
2361	Définition	
2362	Composition biochimique	
2363	Propriétés organoléptiques	
2364	Interêt nutritionnel	
24	- Levures en alimentation animale	24
241	- Alimentation équilibrée des animaux	24
242	- Besoins en acides aminés limitants	24
2421	Rôle de la lysine et DL-Tryptophane	
2422	Rôle de la thréonine et de la méthionine	
243	- Comparaison levures- Soja	26
244	- Avantages	28
245	-Inconvénients	28
25	- Fermentation en discontinu	29
251	- Définition	29
252	- Cinétique de croissance	29
26	- Modélisation	31
261	- Objectif	31
262	- Comment modéliser	31
263	- Modélisation de la croissance	31
3	MATERIELS ET METHODES	32
31	- Souches utilisées	33
32	- Conservation des souches	33
33	- Milieux de culture	33
34	- Fermenteurs utilisés	35
35	- Protocole complet d'une fermentation discon-	35
	tinue	
351	Préparation du milieu	"(
352	- Stérilisation	"
353	- Préparation de préculture	"
354	- Lancement de la culture	"
36	- Mesures faites avant et après la manipulation	37
361	- Prélèvements	"
362	- Biomasse	"
363	- Matière sèche	"
364	- Dosage des protéines	"

4 EXPLOITATION DES RESULTATS	
41 - Cinétique de croissance	40
42 - Activité cellulaire	45
43 - Production de proteines	45
44 - Modélisation de la croissance	52
SYNTHESE	53
CONCLUSIONS	53
ANNEXE	54

--- PROBLEMATIQUE ---

La malnutrition, en particulier la carence en protéines est très répandue. C'est le problème le plus fréquemment évoqué dans le monde actuel.

En effet dans les années 70, la production mondiale en protéines animales, évaluée à 30 millions de tonnes par an, n'a été consommée que par les 2/3 des nations économiquement développées (Senez 72). Pour pallier à ce problème on a fait appel à d'autres sources de protéines provenant de la fermentation des organismes unicellulaires (P.O.U) cultivés sur déchets agricoles fermentescibles.

Le lactosérum est un sous produit de la transformation du lait en fromage, caseine et en dérivés de la caseine. Il est difficile d'estimer avec exactitude la production de cet effluent industriel, du fait que celle-ci dépend du type de fromage et des procédés technologiques utilisés.

D'après la F.A.O 1985 la production moyenne du lactosérum en Algérie est évaluée à 7 millions de tonnes par an. Toutes ces quantités considérables qui sont rejetées dans le milieu naturel posent un problème de nuisance particulièrement accentué, du fait de la forte charge polluante. En effet la valeur élevée de la DBO5 (40000) du lactosérum n'autorise pas son rejet dans les rivières.

Une des solutions de dépollution et de supplémentation en protéines est de valoriser le lactosérum.

La fromagerie BEL (de la Guerrivière 1981) a montré que cet effluent peut servir comme milieu de fermentation des levures lactiques destinées à l'alimentation animale.

De ce fait, notre travail porte sur l'étude des souches de levures *Kluyveromyces Lactis* et *Fragilis* en tant levures aliment.

Trois objectifs sont alors visés :

- 1) Optimiser la croissance cellulaire dans le cas d'une culture pure et d'une culture mixte. Retenir celle qui donne les meilleures performances .
- 2) Etablir un modèle pour la cinétique de croissance de la culture mixte.
- 3) Déterminer le taux de protéines dans le cas des deux cultures et établir pour chacune une équation qui donne la quantité de protéines en fonction de la biomasse .

ooo

PARTIE

THEORIQUE

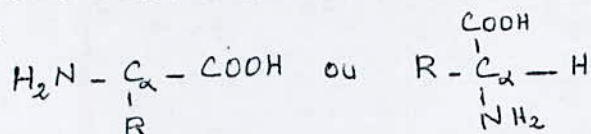
2.1 ACIDES AMINES

L'étude de la structure et du mécanisme biologique des protéines exige une bonne maîtrise de la chimie des acides aminés.

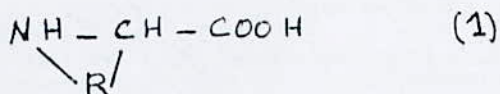
2.1.1 PROPRIETES GENERALES

2.1.1.1 Structure générale:

L'hydrolyse des protéines par des agents tels que NaOH ou HCl conduit à la formation d'acides aminés (A.A) libres de structure générale:



A l'exception de la proline et de l'hydroxyproline qui sont des acides aminés de formule:



- Tous les A.A ont en commun une fonction amine primaire et une fonction carboxyle, portée l'une et l'autre sur le carbone central (C_{α}). Le radical R constitue ce qu'on appelle "la chaîne latérale" par opposition à la "chaîne principale".

2.1.1.2 Les différents types d'acides aminés:

Après hydrolyse d'une protéine par HCl 6 N à 110 ° C pendant 24 heures, on se trouve en présence de trois types d'acides aminés:

- Les A.A naturels présents dans les hydrolysats protéiques et qui sont les éléments constitutifs des protéines. Ils sont au nombre de 20 consignés dans le tableau I

- Les A.A "rares" ou occasionnels présents dans les hydrolysats des protéines mais n'entrant pas dans la composition de celles-ci. Ils résultent de la modification de l'un des A.A protéiques.

- Les A.A que l'on rencontre dans les tissus mais qui sont absents dans les protéines.

2.1.1.3 Classifications:

Plusieurs classifications s'offrent à nous selon que l'on considère les groupements fonctionnels du radical R ou ses propriétés chimiques.

2.1.1.3.1 En fonction des groupements fonctionnels:

7 classifications ont été proposées en fonction des groupements qui composent la chaîne latérale (tab I) (2)

2.1.1.3.2 En fonction des propriétés chimiques du radical:

On distingue :

- Les A.A à chaîne latérale hydrophobe non polaire. C'est le cas d'un radical à chaîne aliphatique simple. Leur faible polarité leur confère un caractère d'insolubilité exp: glycine

- Les A.A à chaîne latérale polaire non chargée : Le radical comprend une fonction polaire supplémentaire (alcool) mais trop faiblement dissociée pour conférer le caractère ionisant.

- Le A.A à chaîne latérale chargée dont:

. A.A chargés positivement: le groupement fonctionnel est une amine d'où le caractère basique (lysine, arginine)

. A.A chargés négativement: ce sont les acides aminés acides (Asparagine, glutamine)

2.1.1.4 Propriétés chimiques:

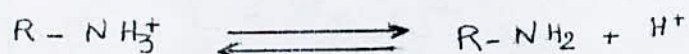
2.1.1.4.1 Équilibre protonique ou ionisation:

L'expression "équilibre protonique" se réfère à l'association et à la dissociation des protons (4)

Tous les A.A contiennent au moins deux groupements ionisables :



en solution ces groupements existent sous deux formes: l'une chargée et l'autre neutre qui sont en équilibre protonique l'une par rapport à l'autre



Dans cet équilibre R-COOH et R-NH₃⁺ sont les donneurs de protons alors que R-COO⁻ et R-NH₂ les accepteurs. De tels composés sont dits amphotères.

Leur ionisation varie avec le pH du milieu (4)

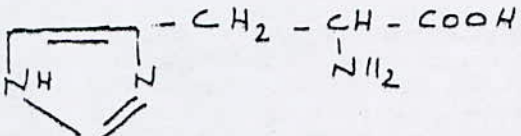
- Le pK d'un groupement ionisable est la valeur du pH pour laquelle les formes associées et les formes dissociées sont présentes en quantités égales.

- Le pHi ou pI est la valeur du pH pour laquelle la molécule d'A.A possède autant de fonctions acides activées (dissociées) que de fonctions basiques

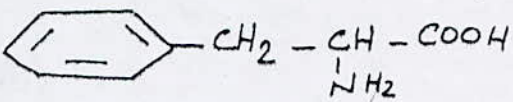
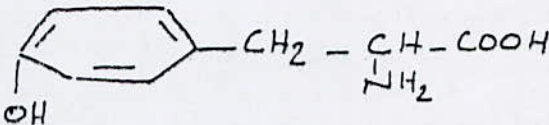
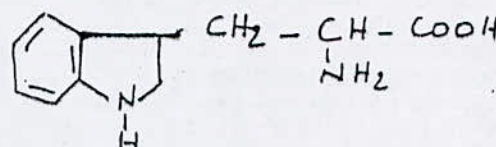
Tableau 1: Acides aminés présents dans Les protéines
Classés en fonction des groupements du radical. (2)

groupe	Nom commun	Symbole	Formule de structure
<u>Les chaînes latérales sont aliphatiques.</u>			
I	Glycine	Gly	$\begin{array}{c} \text{H} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Alanine	Ala	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	Valine	Val	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	Leucine	Leu	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	Isoléucine	Ile	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} - \text{H}_2\text{C} \\ \\ \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
<u>Les chaînes latérales contiennent des groupements hydroxyles.</u>			
II	Serine	Ser	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	Thréonine	Thr	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
<u>Les chaînes latérales contiennent des atomes de Soufre.</u>			
III	Cystéine	Cys	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{SH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$
	Méthionine	Met	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \quad \\ \text{S} - \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$
<u>Les chaînes latérales contiennent des carboxyles ou leurs amides.</u>			
IV	Acide aspartique	Asp	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$
	Asparagine	Asn.	$\text{H}_2\text{N} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$
	Acide glutamique	GLU	$\text{HOOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$
	Glutamine	Gln	$\text{H}_2\text{N} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{NH}_2$

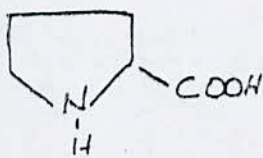
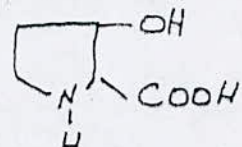
Les chaînes latérales contenant des Groupements basiques.

V	Arginine	Arg	$ \begin{array}{c} \text{H} - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{C} = \text{NH} \\ \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} $
	Lysine	Lys	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array} $
	Histidine	His	

Le radical contient un noyau aromatique.

VI		phe	
	Tyrosine	Tyr	
	Tryptophane	Trp	

Acides Iminés

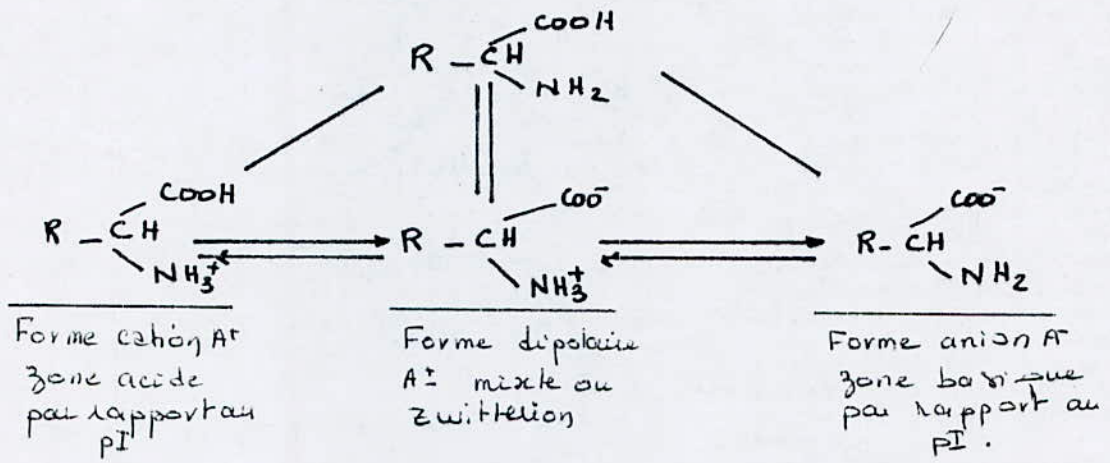
VII	Proline	Pro	
	Hydroxyproline	Hyp	

Source: Précis de biochimie (82)

activées. C'est le point isoélectrique ou isoionique de l'acide aminé considéré. (5)

2.1.1.4.2 Calcul du pI:

Suivant le pH de la solution aqueuse, un acide aminé peut exister sous trois formes possibles:



Chacune de ces dissociations possède une constante d'équilibre:

$$\begin{aligned}
 \text{A}^+ &\rightleftharpoons \text{A}^{\pm} + \text{H}^+ & K_1 &= \frac{[\text{A}^{\pm}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{A}^+]} \\
 \text{A}^{\pm} &\rightleftharpoons \text{A}^- + \text{H}^+ & K_2 &= \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{A}^{\pm}]}
 \end{aligned}$$

Au point isoionique: A⁺ = A⁻, d'où l'on tire:

$$[\text{H}^+]^2 = K_1 \cdot K_2$$

En passant au logarithme décimal:

$$\log [\text{H}^+] = 1/2 (\log K_1 + \log K_2) \quad (4) (5)$$

Graphiquement, le pI se traduit comme suit:

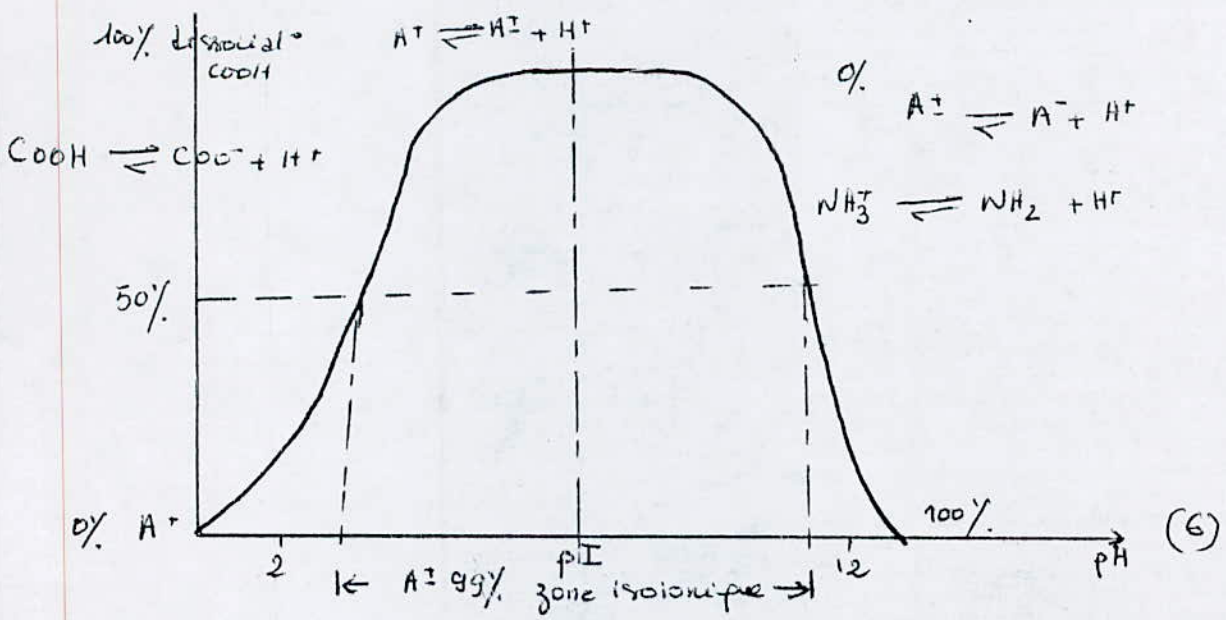


FIG: 1 dissociation de la glycine

Remarque: le même raisonnement s'applique pour un acide aminé à plusieurs groupements fonctionnels.

TABLEAU II: pK des groupements protonables et pI des acides aminés fondamentaux.

ACIDES AMINES	pK1	pK2	pKR	pI
Alanine	2,34	9,69		6,02
Asparagine	2,00	8,80		5,40
Glutamine	2,17	9,13		5,65
Glycine	2,34	9,60		5,97
Isoleucine	2,40	9,70		6,05
Leucine	2,36	9,60		5,98
Méthionine	2,30	9,20		5,75
Phénylalanine	1,80	9,10		5,45
Proline	2,00	10,60		6,30
Sérine	2,21	9,15		5,68
Thréonine	2,63	10,43		6,53
Tryptophane	2,40	9,40		5,90
Valine	2,30	9,60		5,90
Tyrosine	2,20	9,11	10,07	5,65
Acide aspartique	2,09	9,82	3,86	2,98
Acide glutamique	2,19	9,67	4,25	3,22
Cysteine	1,17	10,78	8,83	5,02
Lysine	2,18	8,95	10,53	9,74
Arginine	2,17	9,04	12,48	10,76
Histidine	1,82	9,17	6,00	7,09

PROTEINE STRUCTURE FONCTION

biochimie
1986

Figure 2a - Repliage de la chaîne principale en hélice α . Les liaisons hydrogène qui stabilisent cette configuration sont indiquées par des tirés et les chaînes latérales R portées par les carbones α peuvent être l'un des 20 acides aminés (sauf la proline (figure 1), pour des raisons stéréochimiques).

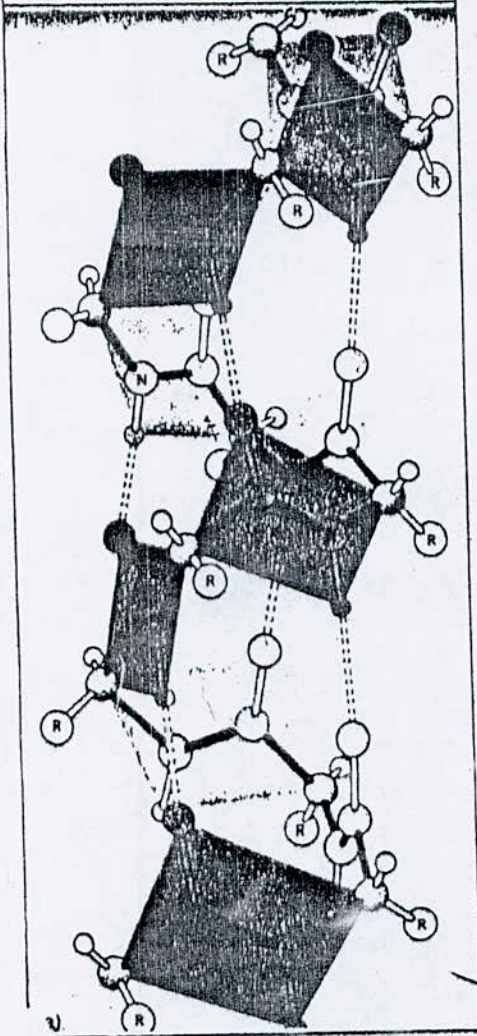
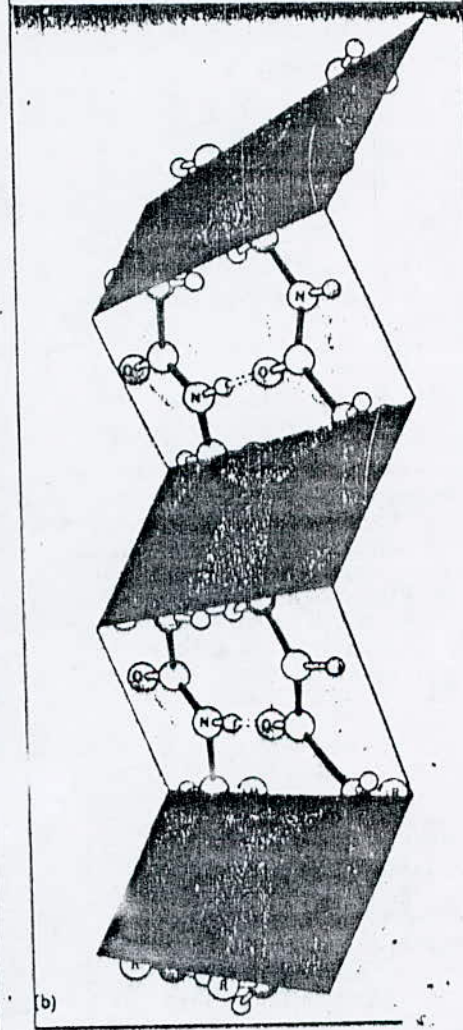


Figure 2b - Formation d'une structure secondaire de type feuillet β par établissement de liaisons hydrogène entre deux segments de chaîne parallèles.



exemple:

Glu-Lys-Ala-Gly-Tyr-His-Ala

La structure primaire est complètement définie si l'on connaît le nombre, le genre et l'ordre linéaire des A.A.

Quand il y a incertitude au sujet de l'ordre exact des résidus spécifiques on place cette portion de la séquence entre parenthèses et on sépare les résidus par des virgules. (2)

Glu-Lys-(Ala, Gly, Tyr,) -His-Ala

2.2.3.2 Structure secondaire:

Elle correspond à quelques types de configurations spatiales régulières et particulièrement stables. Cette structure résulte essentiellement de la formation de liaisons hydrogène (8).

Il existe deux types de structures:

- La forme en α -hélice

Dans cette structure les plans péptidiques s'enroulent autour d'un axe et les résidus d'A.A se retrouvent régulièrement les uns au dessus des autres. Le pas de l'hélice est 4,5 Å, l'élévation par résidu est de 1,5 Å et l'angle formé par les deux plans est d'environ 80°

Les chaînes latérales sont dirigées vers l'extérieur de l'hélice (1) (fig 2,1)

- La forme en feuillet plissé

Contrairement à la forme précédente, les résidus ne s'y élèvent pas autour d'un axe mais sont face à face de deux manières différentes: . parallèle lorsque les chaînes sont de même sens.

. antiparallèles lorsque les chaînes sont en sens inverse, avec alternance des radicaux (11) (fig 2.2)

2.2.3.3 Structure tertiaire:

Elle traduit la configuration spatiale tridimensionnelle. Les liaisons mises en jeu dans cette structure sont au nombre de trois:

- les liaisons covalentes: résultent de la mise en commun d'une paire d'électrons. La liaison disulfure est la plus importante.

- les liaisons électrostatiques formées entre deux groupements de charges opposées:

- les forces de Van Der Waals: forces d'attraction faibles qui n'agissent qu'à courte distance et proviennent de dipôles ionisés (12)
Toutes les protéines possèdent une structure tertiaire et une seule, différente d'une espèce protéique à une autre de sorte que:

- Dans les proteines globulaires, c'est une alternance de segments réguliers mais non quelconques.

- Dans les proteines fibrillaires, le même motif se répète ce qui entraîne une confusion entre les structures secondaire et tertiaire. (9)

2.2.3.4 Structure quaternaire:

Elle correspond à des associations spécifiques presque toujours réversibles entre plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes. En général le nombre de chaînes est très faible (2 à 6) d'où l'appellation d'oligomères. L'adhésion de l'édifice protéique est assurée par des liaisons secondaires. (10)

2.2.4 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

2.2.4.1 Poids moléculaire

Insuline	6000
Ribonucléase	13700
Lysosome	14700
Trypsine	23800
Hémoglobine	60000
γ -Globuline	180000
Myosine	493000
β -Galactosidase	500000
Glutamique Déshydrogénase	1000000

2.2.42 Solubilité des proteines:

La solubilité des proteines dépend de plusieurs facteurs dont la nature du solvant et de la proteine ainsi que les conditions du milieu (pH, T°, force ionique)

- force ionique:

D'une manière générale, la force ionique est donnée par l'équation: $I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$ où: C_i = Molarité de l'ion i

Z_i = Charge électrique de chaque ion

A partir d'une force ionique nulle, la solubilité des proteines augmente par addition de sels (se fait est du à la stabilité des groupements NH₂ et COOH libres). Ainsi certaines proteines sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solutions diluées de NaCl.

Lorsqu'on atteint une certaine valeur de la force ionique (valeur max) on assiste à une diminution de la solubilité et à une précipitation des proteines par suite de l'hydratation des sels ajoutés. (12)

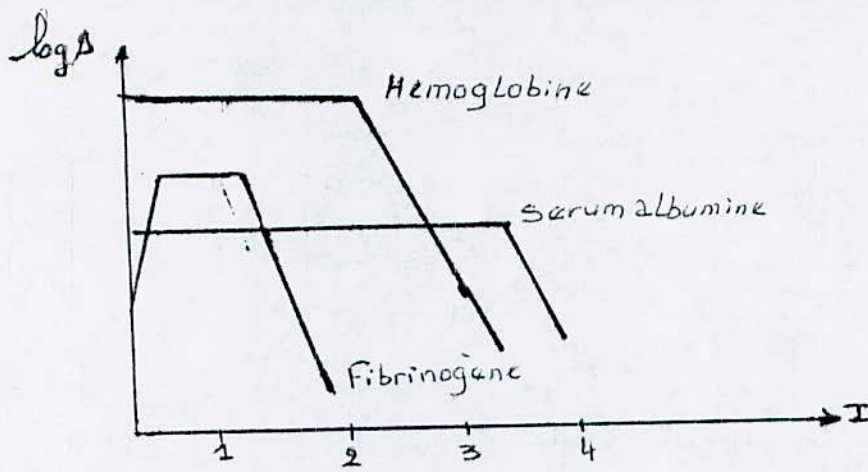


Fig 2: Variation de la solubilité en fonction de la force ionique.

- influence du solvant et du pH:

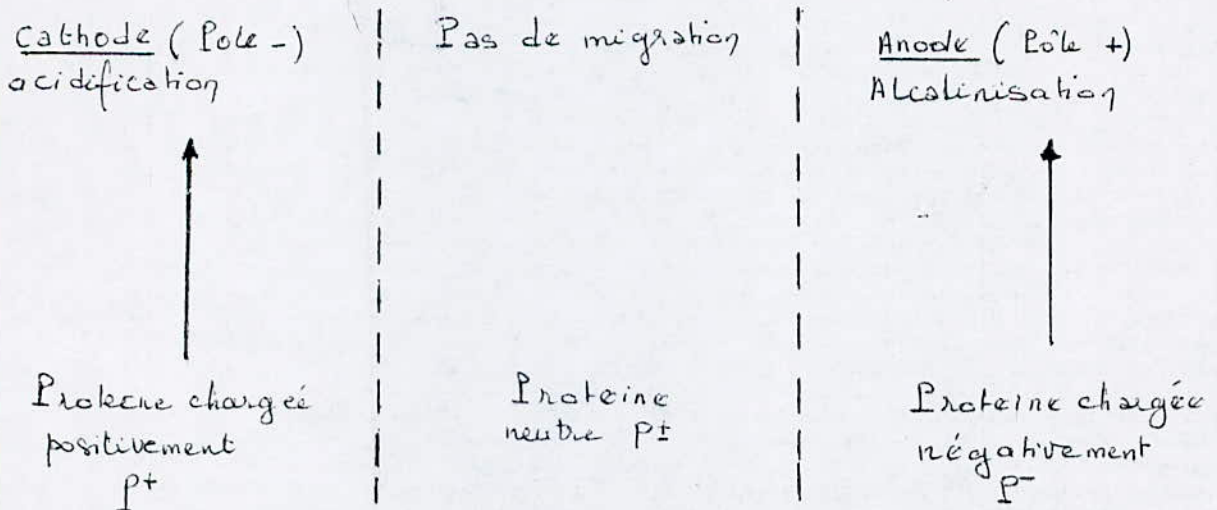
Les solvants apolaires ont un effet inverse à celui des sels. Un abaissement de la constante diélectrique par addition d'un solvant organique a pour effet de réduire la solubilité des molécules dipolaires. Situation particulièrement rencontrée au point iso-électrique où la solubilité est minimale.

- influence de la T° :

La solubilité des protéines augmente dans la gamme $0^\circ\text{C} - 40^\circ\text{C}$. Une modification de la solubilité par effet thermique entraîne la dénaturation des protéines. (4)

2.2.4.3 Propriétés électrolytiques:

Ce sont les mêmes propriétés que celles des acides aminés. le comportement des protéines soumises à un champ électrique est le suivant:



2.3 LES LEVURES

2.3.1 HISTORIQUE

Lors de la découverte du monde microbien, les êtres vivants étaient classés en deux grandes divisions: (13)

- Le règne des animaux
- Le règne des végétaux

Ces deux règnes étaient désignés sous le nom des Histes. Ceci rendait difficile la classification des microorganismes et ce n'est qu'en 1886 que le zoologiste allemand HENKEL proposa le règne des protistes.

Ce dernier comprend deux familles: (14)

- . Les protistes supérieurs ou eucaryotes
 - Algues excéptées les algues bleu-vert.
 - Protozoaires.
 - Champignons (levures- moisissures).
- . Les protistes inférieurs ou procaryotes
 - Algues bleu-vert. ou cyanophycées
 - Bactéries ou schizomycées.

2.3.2 DEFINITION DE LA LEVURE

La levure est un champignon supérieur ayant perdu le pouvoir de former un mycelium cénocytique et est devenu un organisme unicellulaire.

Le mot "levure" évoque les agents de fermentation alcoolique. Mais il existe dans la nature de nombreux microorganismes morphologiquement semblables aux levures et qui pourtant n'ont aucun pouvoir fermentaire. C'est pourquoi leur étude sera entreprise sous le terme de "champignons levuriformes". (14) et 15)

2.3.3 CLASSIFICATIONS


2.3.3.1 Critères de classification:

La classification des levures est basée sur deux critères fondamentaux:

- . Critères morphologiques
 - aspect des colonies sur milieu solide.
 - forme et dimension des cellules.
 - mode de reproduction végétative.
 - aptitude à la formation de spores.
 - aptitude à la formation mycelium.
- . Critères physiologiques
 - aspect des cellules sur milieu liquide.
 - aptitude d'assimilation de l'azote nitrique.
 - aptitude d'assimilation de substrats divers: éthanol matières grasses... (16)

Tableau III: Classification des levures

Source: biotechnologie 88 Ref 16

	Structure végétative	Reproduction asexuée	Genres	Reproduction Sexuée
<p>ASCOSPOROGENES</p> <p>Classe des ascomycètes</p> <p>- cètes</p>	<p>- Cellules végétatives isolées</p> <p>Rondes, ovoïdes ou allongées.</p>	<p>Fission transversale bourgeonnement</p> 	<p>- Sous-classe des HEMI-ASCOMYCÈTES</p> <p>- ordre: endomycétales</p> <ul style="list-style-type: none"> • schizobasidiomycètes • saccharomycètes • + nombreux genres 	<p>- Asques libres et nus contenant des ascospores.</p> <p>- Forme des ascospores</p> <p>Més variées:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sphérique • ovale
<p>BALLISTOSPOROGENES</p> <p>- Classes des Basidiomycètes</p>	<p>- Cellules isolées Pseudomycélium</p>	<p>- bourgeonnement.</p>	<p>- Sporobolomycétales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sporobolomycètes 	<p>- Libération des spores par expulsion brutale dans l'air.</p>
<p>ANASCOSPOROGENES</p> <p>Classes des Deuteromycètes.</p>	<p>- Cellules isolées pseudomycélium</p>	<p>bourgeonnement.</p>	<p>Cryptococcales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Candida • Torulopsis • Cryptococcus 	<p>- ni ascospores</p> <p>- ni ballistospores.</p>

2.3.3.2 Classification:

D'après LODDER et KREGER VANRIJ, les levures se regroupent en trois familles: (15)

1- Famille des endomycétacées: qui fait partie de la classe des ascomycetes. Ces champignons se reproduisent végétativement par bourgeonnement et n'assimilent pas les nitrates. Les asques renferment 1 à 4 ascospores généralement rondes.

Parmi les espèces types, on cite:

- *Saccharomyces cerevisiae*, levure de vinification
- *Saccharomyces Lactis* et *Fragilis* qu'on retrouve dans les produits laitiers.

2- Famille des sporobolomycetaceae, classées Basidiomycetes. Ces levures à métabolisme oxydatif forment des colonies rose-saumon sur milieu solide. Assez peu répandues, on les rencontre sur les graines humides et les matières végétales en décomposition.

3- Famille des Cryptococcaceae, classe des Deutéromyces. Ces levures sont caractérisées par un métabolisme oxydatif mais aussi fermentaire. Leur reproduction végétative se fait par bourgeonnement. exemple le genre *Candida*.

2.3.4 MORPHOLOGIE . COMPOSITION . STRUCTURE

2.3.4.1 Dimension- forme:

Bien qu'il existe une grande diversité dans les aspects morphologiques, la levure typique est une cellule ovoïde. Sa taille généralement plus grande que celle des bactéries peut varier de 1 à 5 microns de largeur et de 5 à 50 microns de longueur. Elle ne possède pas de flagelle et est par conséquent immobile.

Son aspect est plus homogène sur milieu liquide que sur milieu solide. (14)

2.3.4.2 Structure cellulaire:

De l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, on rencontre:

- Une paroi cellulaire particulièrement développée faite de sucres condensés (mannane et glucane) cimentés par une fraction protéique.
- Une membrane cytoplasmique de nature lipoprotéique qui double intérieurement la paroi cellulaire, sa fonction est essentielle pour la vie de la cellule car elle règle les échanges avec le milieu extérieur.

Cytoplasme

Mitochondrie

Membrane nucléaire

Pariet Cellulaire

Membrane Cytoplasmique

Ribosome

Vesicule de Pinocytose

Appareil de Golgi

Nucléole

Noyau

membrane nucléaire

Chloroplaste

Réticulum Endoplasmique

Schema

Schema d'une cellule

de levure typiquement
Eucaryote

tiré du livre

" Microbiologie

1976

clinique "

- Le protoplasma, substance de la vie de la cellule principalement constituée de protéines et de glycogène.

- Le noyau, siège de chromosomes, responsables du maintien des caractères génétiques et organe directeur de l'ensemble des synthèses cellulaires.

- Les ribosomes, siège de la synthèse protéique grâce à leur richesse en ARN (schéma 1)

2.3.5 COMPOSITION BIOCHIMIQUE

La composition biochimique des levures varie d'une espèce à une autre et pour une même espèce elle peut varier dans de grandes proportions selon les conditions du milieu (pH, T°, agitation) et selon le mode de préparation (tab IV)

- Protéines - acides aminés

En règle générale la teneur en protéines des levures est inférieure à celle des bactéries et est à peu près égale à 50%. Les algues ayant une valeur intermédiaire. On y remarque la teneur très élevée des levures en lysine. En revanche leurs teneurs en acides aminés sulfurés sont très faibles. (18)

- Lipides

Ils sont en proportion très variable à l'intérieur d'une même famille. Ils peuvent varier entre 0,5% et 20%

- Acides nucléiques

Leur teneur est plus élevée que dans les protéines végétales ou animales (9 à 17% de l'azote total) (17). Or cet azote nucléique est catabolisé par l'animal sans donner lieu à la synthèse protéique.

- Sels minéraux - oligoéléments

La teneur des levures en calcium est généralement modeste. Celle en phosphore est plus élevée. Mais c'est le potassium et le sodium qui présentent les taux les plus élevés.

Pour les oligoéléments la plupart d'entre eux se trouvent en concentration notablement plus élevée que dans les céréales.

- Les vitamines

Les levures sont d'excellentes sources de vitamines notamment celles du groupe B. Dans les levures à faible teneur en lipides, l'apport en vitamines liposolubles A, D, K, H, est particulièrement faible. E est très faible (18)

TABLEAU IV: Composition biochimique de quelques levures
(CL. FEVRIER 1985. Réf: 18)

Constituants	Levures sur alcanes		Levures sur Glucides	
	Tropicalis	Lipolyticas	Brasserie	Distillerie
Proteines %	59,9	66,2	48,4	41,8
Lysine	7,40	7,80	6,98	7,54
Méthionine	1,80	1,60	1,38	1,56
Cysteine	1,10	0,90	1,08	1,10
Tryptophane	1,40	1,30	1,14	1,10
Thréonine	4,9	5,4	4,59	4,88
Glycine+	9,60	9,60	8,51	8,49
Sérine				
Leucine	7,40	7,80	6,43	6,82
Isoleucine	5,1	5,30	4,44	5,00
Valine	5,9	5,8	5,12	5,91
Histidine	2,10	2,10	2,31	2,15
Ca (g/kg)	0,04	0,50	1,40	3,50
P (g/kg)	14,7	14,0	14,0	15,0
Cu (g/kg)	10	5	25	65
Zn (g/kg)	910	70-800	60	10
Mn (g/kg)	300	200	5	20
Co (g/kg)	4	4	0,2	0,1
B1 (mg/kg)	4	-	85	40
B2 (ng/kg)	-	180	45	35
B12 (ng/kg)	-	0,001	0,008	-

Acides aminés (g/16 g D'azote)

2.3.6 LES LEVURES LACTIQUES

2.3.6.1 Définition:

Les levures lactiques sont des champignons supérieurs appartenant à la classe des ascomycètes et utilisent spécifiquement le lactose comme source d'hydrate de carbone. Elles se différencient des autres levures par : - La structure des matières grasses qui les composent et qui est identique à celle du lait.

- La composition des membranes qui comprend des corps facilement digestibles (galactomannane et glucogalactone).

- Leur teneur élevée en protéines et en glutathion.

- Leur teneur élevée en vitamines (19).

2.3.6.2 Composition biochimique des levures lactiques

Les tableaux V,1; V,2; V,3; Nous donnent la composition moyenne des levures lactiques en ses différents constituants.

Le choix des levures est basé selon les critères suivants:

- domination de la souche pour produire des protéines.

- résistance de la souche aux métabolites.

- résistance de la souche aux changements des conditions de culture

TABLEAU V,1: Composition analytique globale (g/100g) de la levure lactique
(De la GUERRIVIERE)

Composants	Teneur (%)
Humidité ;	4,5
Matières protéiques	50
Glucides	30,3
Lipides	6,0
Minéraux	8,1
Choline	0,5
Glutathion.	0,5
Vitamines B	0,07
Vitamine C	0,06

- Teneur maximale en A.A indispensables et en vitamines

- Croissance rapide sur un substrat peu coûteux (20)

TABLEAU V,2 Composition moyenne en acides gras de la levure lactique
(mg/100 g) (De la GUERRIVIERE) 1981

Acides gras	Symbole	Teneur(mg/100 g)
Butyrique	C4	10
Laurique	C12	5
Myristique	C14	30
Pentadécanoïque	C15	20
Palmitique	C16	9,0
Palmitoleïque	C'16	180
Héptadécanoïque	C17	50
Stéarique	C18	85
Oleïque	C'18	985
Linoléïque	C"18	705
Linoléniq ueC"18	250
Arachidonique	C20	5
Gadoleiqu eC20	5

TABLEAU V,3 Répartition des vitamines en mg/100g de levure lactique
Valeurs moyennes (I.A.A 25)

Vit. hydrosolubles

Thiamine	B11,0 à 5,0
Riboflavine	B22,5 à 5,0
Nicotinamide	B3 ou PP	35 à 45
Acide pentothénique.	B5	8,0 à 15
Pyridoxine	B6	0,80 à 1,20
Biotine	B8 ou H	0,04 à 0,09
Acide foliqueBC	1,8 à 2,0
CobalamineB12	0,0005 à 0,0015
Acide ascorbique vraiC	65 à 75

Vit. liposolubles

EE	25 à 45
-------------	--------------	---------

2.3.6.3 Propriétés organoléptiques

La levure lactique se caractérise par une couleur beige claire et une faible saveur " SUI GENERIS " sans amertume. Cette saveur destine la levure lactique aux nutriments salés où elle pourra être quantitativement beaucoup plus représentée que dans les aliments sucrés. (21 et 22)

2.3.6.4 Interêt nutritionnel

Certaines levures ont un grand intérêt nutritionnel dû à leur composition chimique et biochimique. Elles sont alors communément appelées " levures-Aliment " .

2.4 LES LEVURES EN ALIMENTATION ANIMALE

Les recherches en alimentation animale ont pour objet de concevoir les régimes alimentaires permettant d'assurer la couverture des besoins des différentes espèces animales (23)

2.4.1 ALIMENTATION EQUILIBREE

La majeure partie des protéines utilisées pour l'élevage est fournie par les céréales qui en contiennent environ 10% et qui sont déficientes en plusieurs A.A essentiels (24).

Pour cela l'élevage des monogastriques a fait appel à des protéines complémentaires apportées essentiellement par la farine de poisson et les tourteaux de Soja qui sont relativement bien équilibrés et bien adaptés aux exigences nutritives de la croissance des animaux.

Comme les fluctuations sur les prix affectent aussi bien la farine de poisson que le Soja, on se retrouve face à un manque de protéines alimentaires. Pour pallier à cette situation et replacer le problème des A.A dans leur utilisation comme additifs alimentaires, on a fait appel à d'autres sources de protéines, celles qui proviennent de la fermentation des microorganismes unicellulaires (S.C.P) dont les levures (24) (25).

2.4.2 BESOINS EN ACIDES AMINES LIMITANTS

Rappelons que la vingtaine d'A.A de la série L sont les matériaux de base de la quasi totalité des protéines. Mais tous ces A.A n'ont pas la même valeur nutritionnelle. Souvent les A.A les moins abondants dans les plantes sont ceux les plus nécessaires pour l'alimentation des hommes et de animaux. Les levures, par leur richesse protéique et leur teneur élevée en vitamines contribuent en grande partie à résoudre ce problème; (9)

2.4.2.1 Rôle de la L-Lysine et du D.L-Tryptophane

La lysine est utilisée comme additif dans le régime lorsque les céréales forment la base de l'alimentation du bétail où elle représente le facteur limitant primaire. Son absence dans la ration provoque un trouble dans le métabolisme de l'azote, une perte de poids et des troubles de l'érythropoïèse. (26)

Des travaux classiques de BLOCK ont montré l'intérêt de compléter la farine par le lait et la levure, le facteur limitant de la première étant la lysine alors que la levure en contient d'importantes proportions (20).

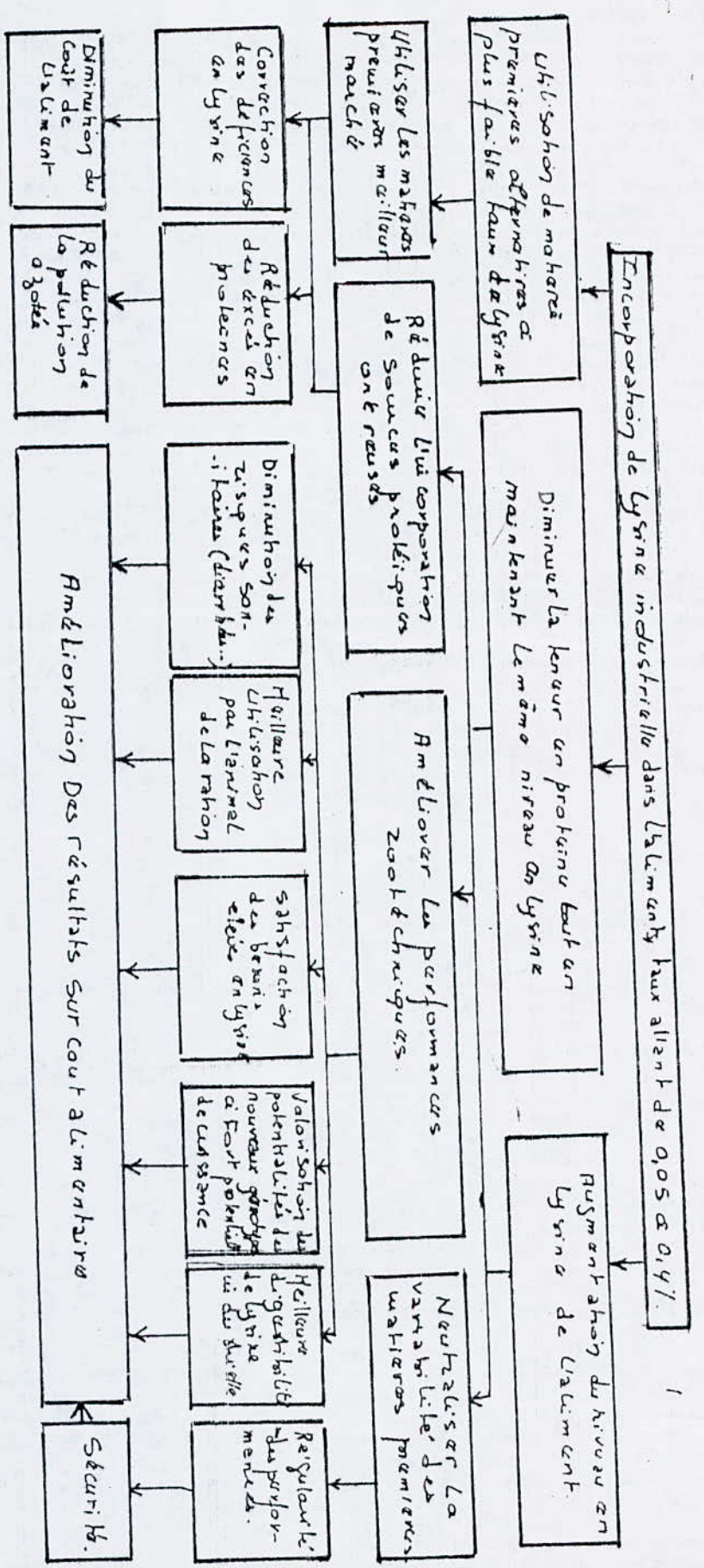


TABLEAU II INTERET DE LA LYSINE PURE INDUSTRIELLE EN ALIMENTATION ANIMALE.

Aliment

Notation

Arguments

Résultats

L'emploi du D.L-Tryptophane, facteur limitant dans le régime à base de maïs reste limité par son coût relativement élevé . Mais si son prix venait à baisser, la demande mondiale serait de 11000 T/an dans les années 91. (25)

2.4.2.2 Rôle de la méthionine et de la thréonine.

La méthionine, un des A.A limitant l'assimilation, se trouve en quantité insuffisante aussi bien dans le Soja que dans les levures. Mais un couplage avec d'autres aliments peut équilibrer la ration.

A titre d'exemple on pourra citer le couplage relevé par ANDRE et RIBADEAU-DUMAS qui s'est montré particulièrement bénéfique entre la levure et le tournesol. Ce dernier apportant la méthionine alors que la levure apporte un appoint de lysine à cette association. (20)

Quant à la thréonine, elle apparaît souvent comme facteur limitant secondaire dans les aliments de bétail à base de blé ou d'orge. Les levures peuvent dans ce cas contribuer à l'équilibre rationnel par leur teneur élevée en cet aminoacide.

CONCLUSION:

L'incorporation des levures dans la ration alimentaire vise trois objectifs: - abaisser le taux de protéines global dans l'aliment.

- compléter en A.A indispensables.

- diminuer le coût des formules sans altérer les performances zootechniques des animaux.

Le tableau VI illustre d'une manière schématique l'intérêt des A.A de synthèse en alimentation animale (cas de la lysine).

2.4.3 UTILISATION DES LEVURES DANS

L'ALIMENTATION ANIMALE. COMPARAISON AVEC LE SOJA

Pour voir comment les bioprotéines ont concurrencé le Soja sur le marché de l'alimentation, analysons les tableaux VII (1,2) donnant les besoins en A.A des animaux ainsi que les apports du Soja et des levures (21): - chez le poulet, on assure 88% du besoin en lysine avec les levures et seulement 53% avec le Soja.

- la thréonine qui représente le troisième facteur limitant dans la ration protéique des volailles est apportée par les levures à 83% des besoins, le Soja n'encouvre que 44%.

- quant aux A.A soufrés, on remarque la déficience des levures.

Ces dernières ne couvrent que 37 % des besoins contrairement au Soja qui en assure 44 %.

- Pour assurer la couverture totale du besoin en lysine avec un tourteau de Soja à haute valeur nutritive il faudra, sans tenir compte des céréales dont le taux en cet A.A est faible, incorporer dans la ration volaille environ 28 % de tourteau, 17 % seulement de levures couvrant les besoins. Dans le cas de l'alimentation du bétail, si l'on ne tient pas compte des A.A soufrés et des céréales dans la ration, tous les besoins sont largement couverts par une incorporation de 15 % de P.O.U dans la ration alors qu'il convient d'apporter 23 % de tourteau de Soja de haute valeur nutritive pour couvrir les besoins en lysine.

TABLEAU VII : Comparaison : levure-Soja

Table VII 1 Couverture des besoins en A.A.I dans la ration du poulet de 4 semaines.

Besoins en A.A.I	Apports/15% de levures	Apports/15% de Soja	Difference en+ ou - des levures avec le Soja
Arginine 1,05	0,24	0,29	+ 0,05
Histidine 0,35	0,22	0,21	- 0,01
Isoleucine 0,05	0,57	0,39	+ 0,18
Leucine 1,40	0,84	0,61	+ 0,23
Lysine 0,95	0,84	0,51	+ 0,33
Méthionine +cysteine 0,75	0,27	0,32	- 0,05
Valine 0,85	0,62	0,42	+ 0,20
Thréonine 0,70	0,58	0,31	+ 0,27
Tyrosine 0,70	0,43	0,31	+ 0,12

Table VII 2 couverture des besoins en A.A.I dans la ration du porcelet et bétail

Histidine 0,21	0,22	0,21	+ 0,01
Isoleucine 0,57	0,57	0,39	+ 0,18
Leucine 0,77	0,84	0,51	+ 0,33
Méthionine +Cysteine 0,57	0,27	0,32	- 0,05
Phénylalanine +Tyrosine 0,51	0,94	0,73	+ 0,21
Valine 0,51	0,62	0,42	+ 0,20

2.4.4 AUTRES AVANTAGES DE LA LEVURE

Le consommateur de la levure bénéficie conjointement de tous les autres nutriments qu'elle contient et qui sont:

- les sels minéraux : En alimentation animale, les éléments minéraux susceptibles de faire défaut sont divisés en deux groupes:
 - . les éléments majeurs: Ca, P et Mg
 - . les oligoéléments: Cu, Zn, Mn et Se (23)
- les vitamines : la levure est riche en vitamines notamment celles du groupe B. Son incorporation dans la ration améliore de beaucoup la valeur de l'aliment.

2.4.5 INCONVENIENTS DE LA LEVURE

Lors de la consommation de la levure, certains de ses nutriments peuvent poser un problème. C'est le cas des lipides et des acides nucléiques (27)

- Les lipides: les lipides peuvent être une source de nuisance du fait de leur composition (28): plus de la moitié sont des acides polyinsaturés. Les doubles ou triples liaisons sont susceptibles d'être oxydées pendant la préparation ou le stockage. Les lipides oxydés, réagissent avec les protéines en diminuant la valeur nutritive de celles-ci et en modifiant les propriétés technologiques (goût, odeur...)

- Les acides nucléiques : les cellules microbiennes arrivent à contenir 8 à 25 g d'acides nucléiques pour 100 g de protéines, teneur beaucoup plus élevée que celle du foie qui ne dépasse pas les 4 g .

Si l'alimentation humaine est riche en acides nucléiques, des dépôts d'acide urique peuvent se former dans les reins, la vessie, ou les articulations provoquant ainsi la crise de goutte.

Mais les techniques actuelles ont permis de réduire le taux des acides nucléiques et des lipides de manière à pouvoir utiliser les levures-Aliment sans trop de risques ultérieurs d'intoxication.

_____000_____

2.5 F E R M E N T A T I O N D I S C O N T I N U E

2.5.1 D E F I N I T I O N

La fermentation est une bioconversion d'un substrat donné en production cellulaire et métabolites. Elle est schématisée par:



Les conditions de culture sont choisies suivant le produit final que l'on veut obtenir ainsi que le métabolisme de la fermentation.

Nous nous intéresserons particulièrement à une fermentation aérobie pour une production de levures. Ces dernières seront utilisées comme source de protéines pour les animaux.

2.5.2 C I N E T I Q U E D E C R O I S S A N C E

La croissance cellulaire comprend les étapes suivantes:

- Une phase de latence qui suit immédiatement l'ensemencement de la levure dans le milieu de culture. Dans cette phase, la concentration cellulaire reste constante et égale à la concentration initiale X_0 . La vitesse de croissance dX/dt en g/l ainsi que le taux spécifique dX/Xdt en H^{-1} sont nuls.
- Une phase de départ qui correspond au début de la reproduction. X augmente lentement tout d'abord puis plus vite.
- Une phase exponentielle qui commence lorsque la vitesse de reproduction atteint son maximum. Au cours de cette phase le taux de croissance est constant et maximal.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} \cdot \mu_{\max}$$

Par intégration on obtient: $X = X_0 e^{\mu_{\max}(t-t_0)}$

le temps de génération pour lequel $X = 2 X_0$ est $G = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$

- Une phase de ralentissement qui traduit l'épuisement du milieu de culture. L'activité et le taux de croissance diminuent.
- Une phase stationnaire où X atteint son maximum X_f . La croissance s'arrête et les cellules conservent leur activité métabolique.
- une phase de déclin: Le nombre de cellules viables diminue et la concentration en biomasse décroît par suite de l'autolyse des cellules sous l'action des enzymes qu'elles contiennent.

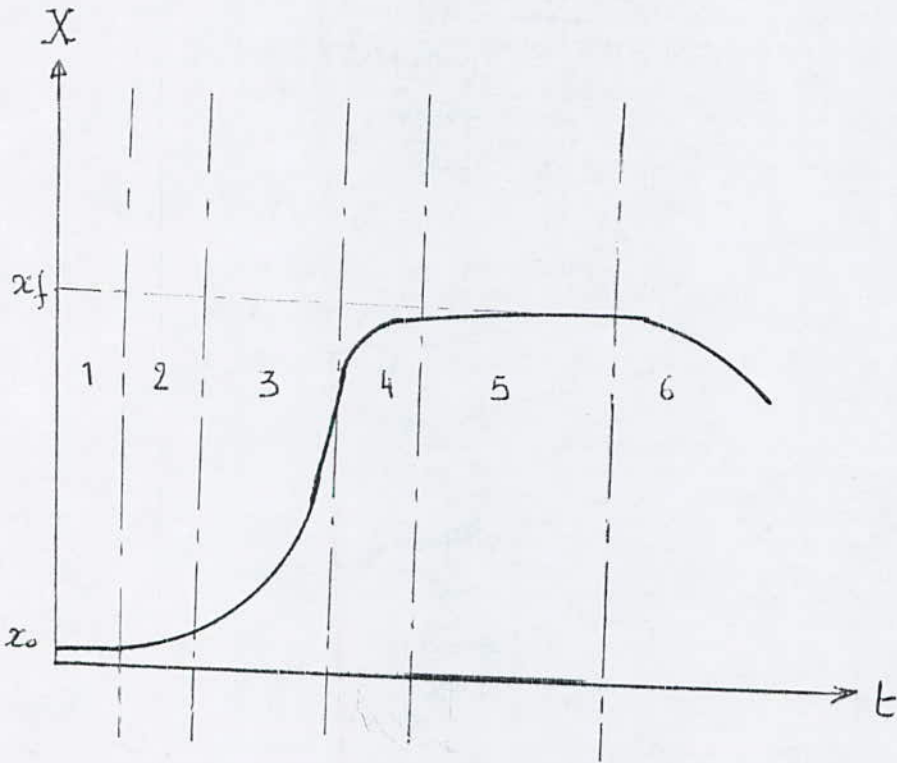


Fig:4 Cinétique de croissance.

2.6 M O D E L I S A T I O N

La modélisation des procédés cellulaires occupe un rôle central dans le génie biochimique moderne. Les résultats sont en effet des outils pour l'interprétation, l'extrapolation et l'automatisation des procédés technologiques.

2.6.1 O B J E C T I F D E L A M O D E L I S A T I O N

L'objectif du modèle est de pouvoir décrire les variations, dans le milieu de culture, des concentrations des principaux paramètres impliqués dans la réaction microbienne.

2.6.2 C O M M E N T E T A B L I R U N M O D E L E

A partir des résultats expérimentaux, une équation mathématique est établie traduisant d'une façon précise le phénomène que l'on veut analyser. Cette équation fait intervenir tous les paramètres que l'on souhaite étudier.

2.6.3 M O D E L I S A T I O N D E L A C R O I S S A N C E

Pour la cinétique de croissance, le modèle le plus utilisé est la relation empirique de MONOD. Celle-ci exprime le taux de croissance en fonction de la concentration du substrat S:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_s} \quad (16)$$

où K_s : La concentration en g/l du substrat pour laquelle $\mu = \mu_{\max}/2$. elle représente la concentration du substrat au dessous de laquelle il devient limitant.

S: La concentration du substrat en g/l .

Cette équation traduit le fait que la croissance n'est limitée que par un seul et unique substrat S.

On suppose que l'oxygène et la source d'azote ne sont pas limitants et qu'il n'y a pas production d'inhibiteurs dans le milieu réactionnel

ooo

M A T E R I E L S

&

M E T H O D E S

3.1 SOUCHES UTILISEES

Parmi les levures lactiques, nous avons retenu les souches Kluyveromyces Lactis (KL) et Kluyveromyces Fragilis (KF). Ces levures sont aérophiles et ont la capacité de donner un rendement de protéines supérieur à celui des autres espèces Kluyveromyces. Le lactose est le facteur limitant la croissance.

Les principaux paramètres de culture retenus par l'industrie B.E.L sont

- pH : 3,5
- T° : 35,5 °C
- Une grande aération
- Une bonne agitation.

On travaillera respectivement en culture pure avec KF et en culture mixte avec KF + KL

$$\frac{1}{1} \frac{m}{M}$$

3.2 CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches de levures sont maintenues en vie par des repiquages mensuels en milieu gélosé incliné BACTOYE AST-MALT-EXTRA CT-AGAR à raison de 38 g/l (DIFCO 0770-01)

Après stérilisation et ensemencement, les tubes gélosés sont portés à incubation à 30 °C pendant 24h. La conservation se fait à +4 °C afin de permettre aux levures de garder leur vitalité.

3.3 MILIEU DE CULTURE

Pour que les microorganismes puissent développer et accomplir normalement leur fonction, il est nécessaire qu'ils trouvent dans leur milieu nutritif:

- une source d'azote
- une source de carbone
- une source d'oxygène
- des oligoéléments
- des facteurs de croissance.

Nous avons utilisé un milieu synthétique dont la formulation est la suivante:

- substrat: lactose codex (GIFER)	
- extrait de levure (BIOKAR 112002)	1 g/l
- KH ₂ PO ₄	2,81g/l
- NH ₄ Cl	7,63g/l
- solution d'oligoéléments (Tab I)	1 ml/l
- solution de métaux (Tab I)	1 ml/l

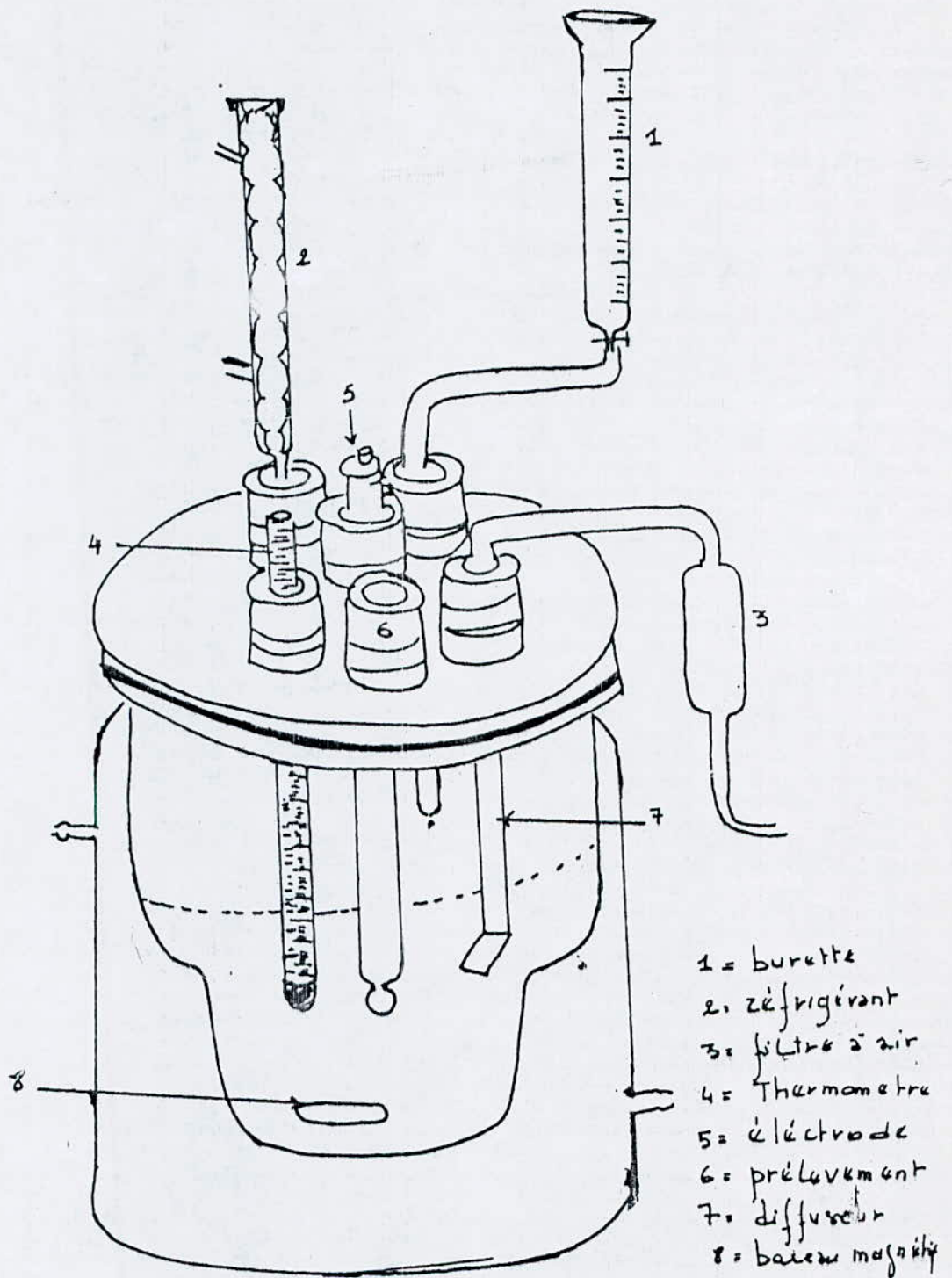


Schéma d'un mini fermenteur.

3.4 FERMENTEURS UTILISÉS

Pour atteindre notre objectif qui est la bioconversion du lactose en biomasse, nous avons utilisé deux minifermementeurs de 150 ml de contenance illustrés par le schéma de (2)

3.5 PROTOCOLES COMPLETS D'UNE FERMENTATION EN DISCONTINU

3.5.1 Préparation du milieu

250 ml du milieu de culture sont répartis en deux volumes:

M1, de 100 ml, servira pour la préculture .

M2, de 120 ml, sera le milieu de culture.

Après avoir ajusté le pH de M2 à 4,5, et celui de M1 à 4,0 par ajout d'une solution tampon (acide citrique + $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) on met chacun des milieux dans un fermenteur muni d'un barreau magnétique et d'un diffuseur. Les autres rodages seront bouchés à l'aide de coton et de papier aluminium.

3.5.2 Stérilisation

Afin de minimiser les risques de contamination on veillera à stériliser les accessoires suivants:

- les minifermementeurs contenant le milieu.
- un flacon de soude 0,2 N fermé .
- une série de pipettes de 1 ml .
- deux pipettes de 10 ml .
- une burette .
- deux réfrigérants .

Après autoclavage à 120 ° C pendant 20 min, on laisse le matériel stérile refroidir à T° ambiante.

3.5.3 Préparation de la préculture

A l'aide d'une anse en platine, stérilisée au bec bunsène, on procède à un prélèvement de cellules à partir du milieu d'entretien, puis on l'introduit dans le fermenteur M1 . Cette préparation est incubée à 35,5°C pendant 16 H sous agitation magnétique et bonne aération. Elle servira comme inoculum pour la culture.

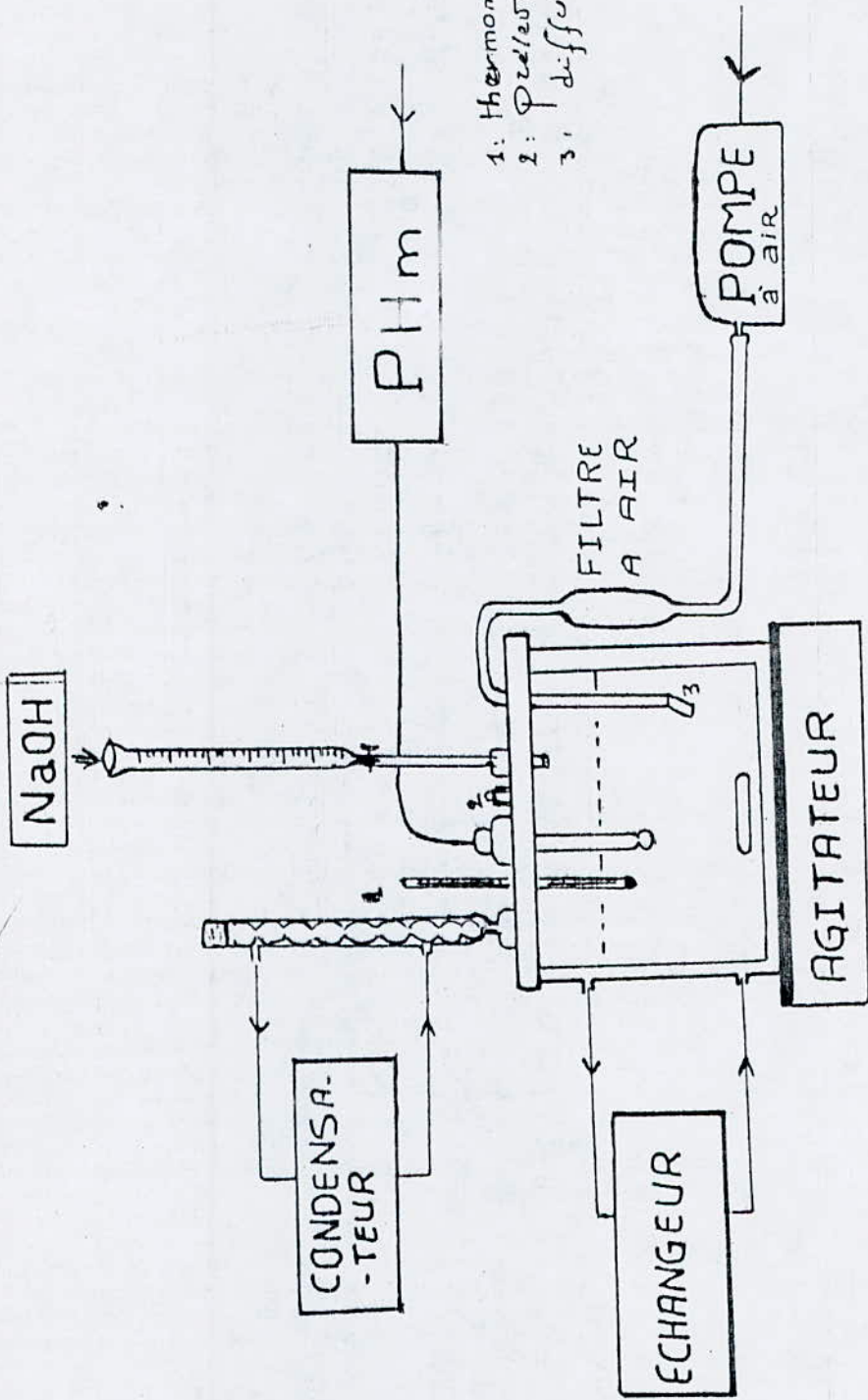
3.5.4 Lancement de la culture

- On connecte le système de chauffage thermostaté au fermenteur ainsi que le système réfrigérant.

- On connecte les tuyaux reliant la burette chargée de soude au fermenteur.

- La stérilisation du thermomètre et de l'électrode de verre préalablement étalonnée se fait par immersion dans de l'eau oxygénée pure, puis

SCHEMA 3: INSTALLATION



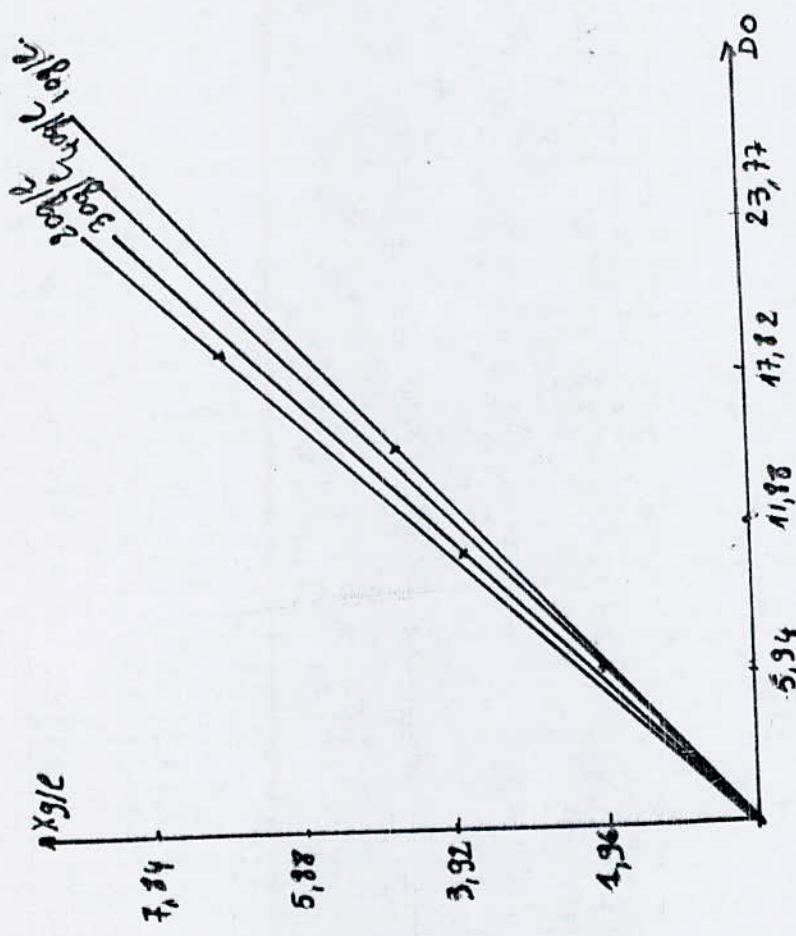


FIG1: Courbe d'étalement de la biomasse pour une culture mixte

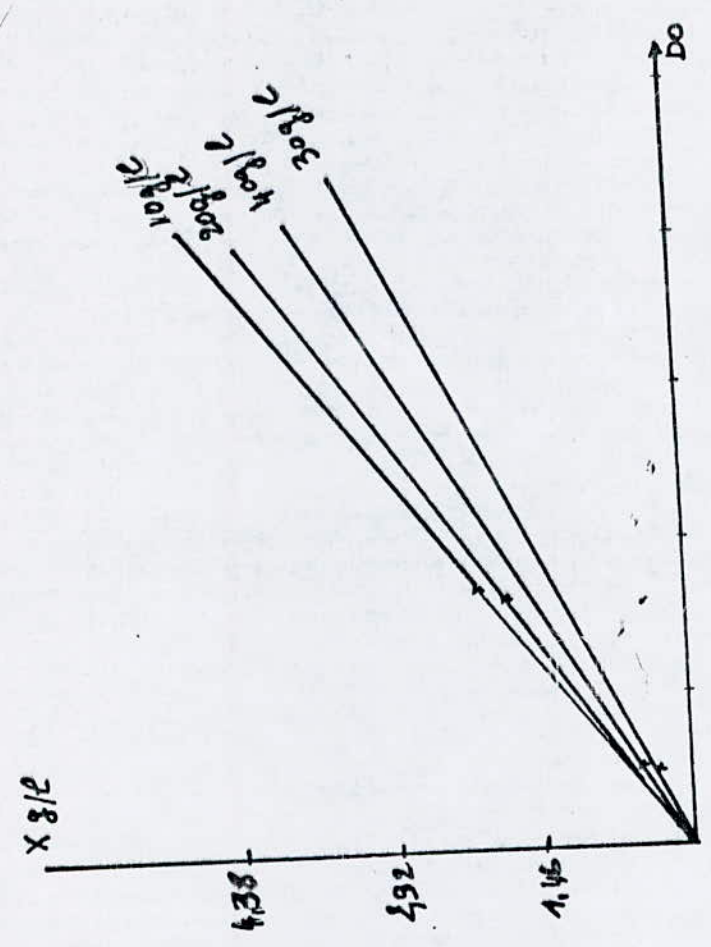


FIG2 Courbe d'étalement (pour une culture pure) de la biomasse.

dans de l'eau bouillante pendant 5 à 10 min. Ensuite on les introduit aseptiquement dans les rodages.

- On met l'aérateur, la plaque d'agitation et les circuits précités en marche. Puis on introduit l'inoculum dans le milieu M2 à raison de 10 % et cela dans les conditions de stérilité. La fermentation étant ainsi lancée, on procède aux mesures.

3.6 MESURES FAITES PENDANT OU APRES LA MANIPULATION

3.6.1 Prélèvements

Toutes les 30 min on réalise aseptiquement des prélèvements de 1 ml du milieu de culture à l'aide d'une pipette stérile.

3.6.2 Biomasse

0,5 à 1 ml du milieu prélevé sont dilués avec de l'eau distillée, le rapport de dilution va de 1/5 au début de la manipulation à 1/40 en fin de fermentation.

On mesure la turbidité de l'échantillon dilué à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV 120. 20

Connaissant la matière sèche à la fin de chaque fermentation ainsi que la densité optique correspondante, on pourra calculer la biomasse X conformément à la relation ci-après:

$$X \text{ (g/l)} = \frac{\text{M.S} \quad \text{DO (t)}}{\text{DO (f)}}$$

où : M.S = matière sèche en g/l

DO (t) = densité optique mesurée à l'instant t.

DO (f) = densité optique finale.

3.6.3 Matière sèche

La détermination de la matière sèche est effectuée sur 60 ml de suspension de levures, centrifugée pendant 15 min à 3000 t/min. Le culôt est lavé à l'eau distillée puis centrifugé. L'opération est répétée trois fois. Le culot lavé est remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée et placé dans une capsule tarée. Le séchage se fait à l'étuve à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant.

3.6.4 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de LOWRY, applicable aux solutions diluées :

- à 1 ml d'échantillon préalablement dilué avec du HCl 0,2 N, on ajoute 5 ml de NaOH 0,2 N et 0,6 ml de réactif ciocalteux.

- après 5 min (puis 40 min) on lit la densité optique à 750 nm contre un

blanc constitué de 1 ml de HCl 0,2 N à la place de l'échantillon.
↓ le taux de protéines est calculé à partir de la courbe d'étalonnage
réalisée sur la (B.S.A) (sérum albumine bovine)

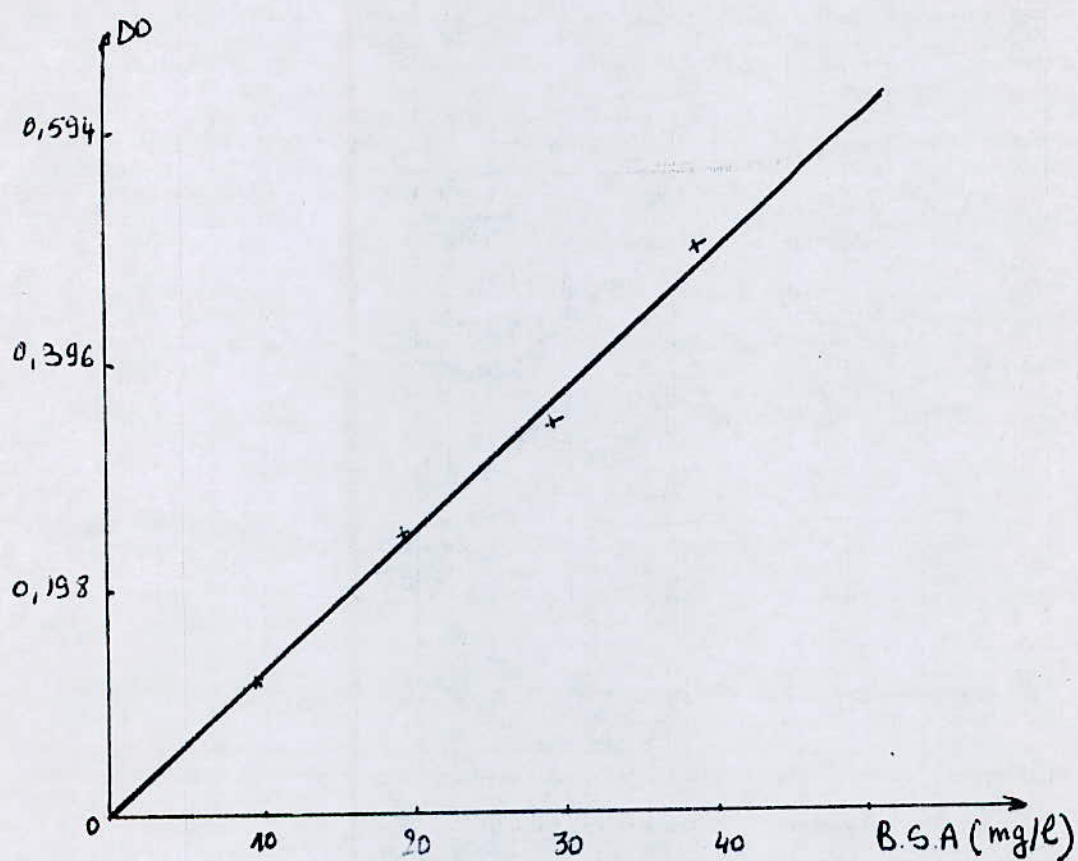


Fig 2: Courbe d'étalonnage des protéines

EXPLOITATION

DES

RESULTATS

Dans ce présent chapitre nous allons essayer d'interpréter nos résultats expérimentaux relatifs aux cultures pures et mixte.

4.1 CINETIQUE DE CROISSANCE

Les fig(3 et 4) nous donnent les cinétiques de croissance pour différentes concentrations du substrat. Les résultats sont regroupés dans le - on remarque que dans le cas de la culture mixte on obtient de meilleures performances de croissance dans le milieu M2 contenant 2% de lactose avec un temps de latence d'environ 2h. La concentration maximale en masse (7,75 g/l) est obtenue après 6 h 30 min de fermentation.

- à 1% et à 3% de lactose et dans le même milieu M2 on obtient la même évolution mais avec un temps de latence relativement court (1 h 30 min pour 1% de lactose et 1 h 40 min pour 3%) et une concentration maximale en biomasse plus faible ($X = 1,67$ g/l pour 1% de lactose et 2,74 g/l pour 3%).

- dans le cas de la souche pure, on voit d'après les courbes que les milieux M2 contenant respectivement 10 g/l et 20 g/l de lactose sont les plus favorables à la croissance de *Kluyveromyces fragilis*.

En effet pour le premier milieu on atteint une biomasse maximale au bout de 5 h 30 min après 1 h 30 min d'adaptation et 3 h 15 min de croissance cellulaire. Alors que pour le deuxième milieu la fermentation est plus lente (temps de latence 2h, phase exponentielle 3h 25 min) mais le rendement est aussi bon.

- Au delà d'une certaine concentration de lactose supérieure à 30 g/l pour la culture pure et 40 g/l pour la culture mixte, on observe une mauvaise croissance cellulaire qui se manifeste par un temps de latence plus grand et une concentration en biomasse de plus en plus faible. Ceci pourrait être dû à une inhibition par le substrat.

4.2 ACTIVITE CELLULAIRE

Pour mieux comprendre le déroulement de notre fermentation, nous avons procédé à une dérivation ponctuelle graphique de la courbe de croissance et déterminé l'influence de la concentration du substrat sur l'activité en fonction du temps.

D'après les figures (5 et 6) on remarque que toutes les courbes ont la même allure et comportent 4 à 5 étapes suivant le cas présenté à savoir:

- une première phase où l'activité est nulle. C'est le cas de la culture pure pour un milieu contenant 20 et 30 g de lactose respectivement
- une deuxième phase où l'activité croît progressivement en fonction du temps.

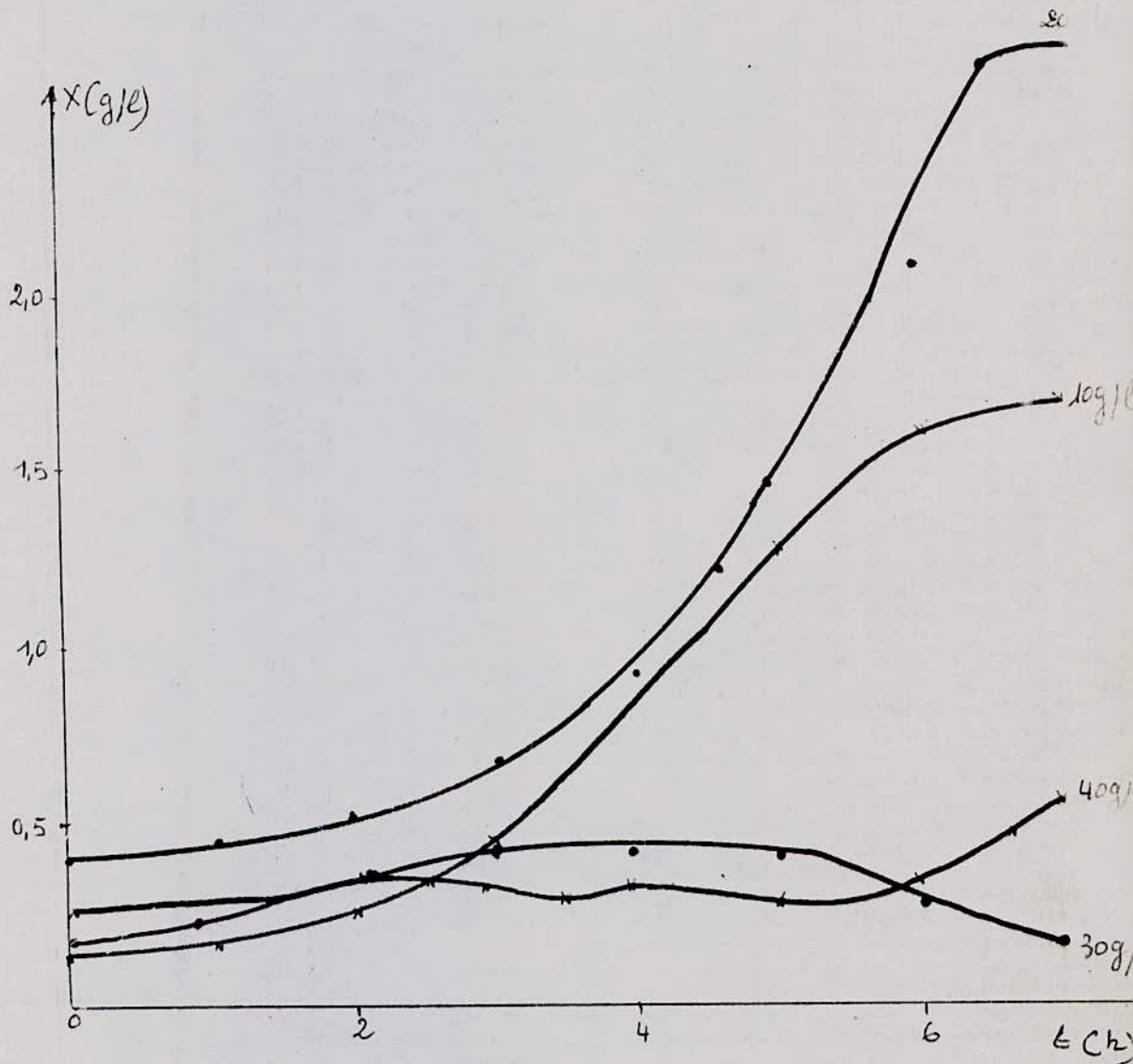


FIG 3: Evolution de la biomasse en fonction du temps dans le cas de la culture pure.

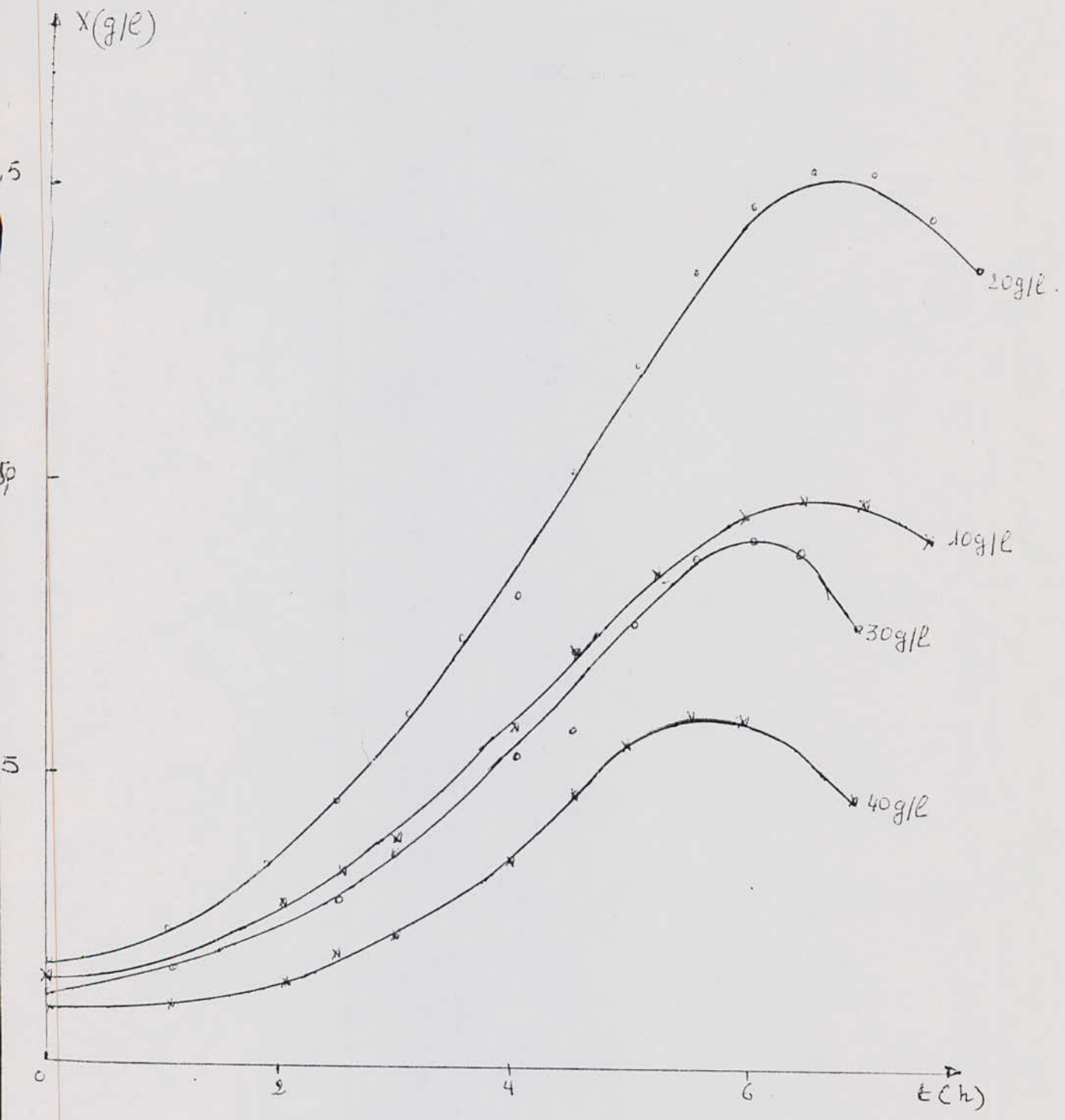


FIG 4: Evolution de la biomasse en fonction du temps en fonction de $(k.L + k.F)$.

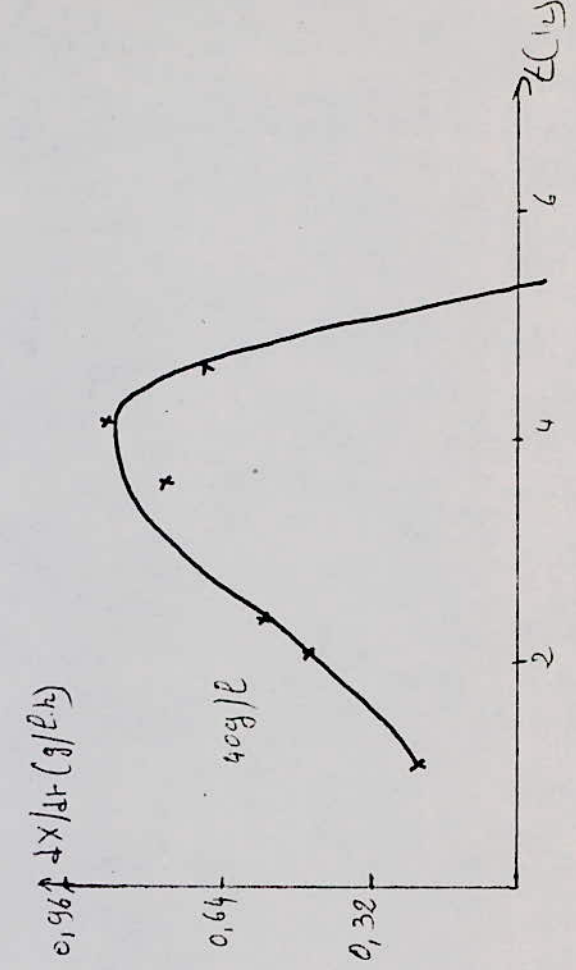
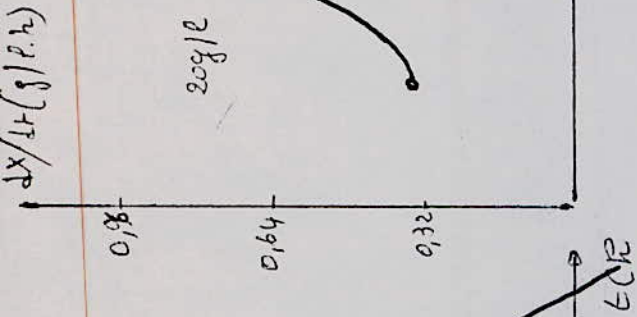
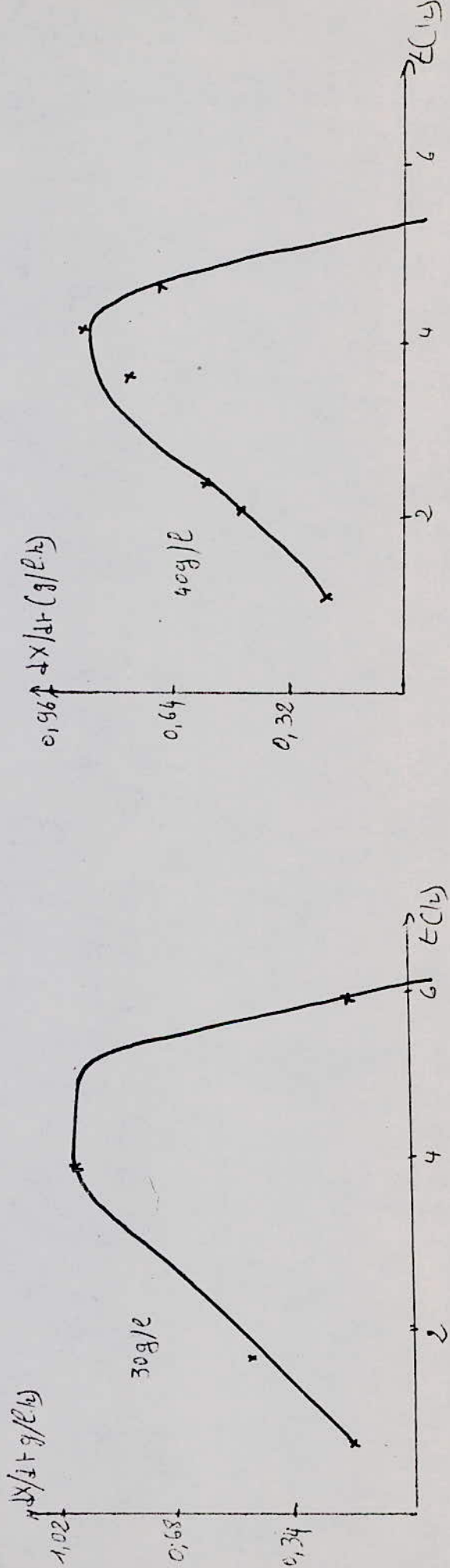
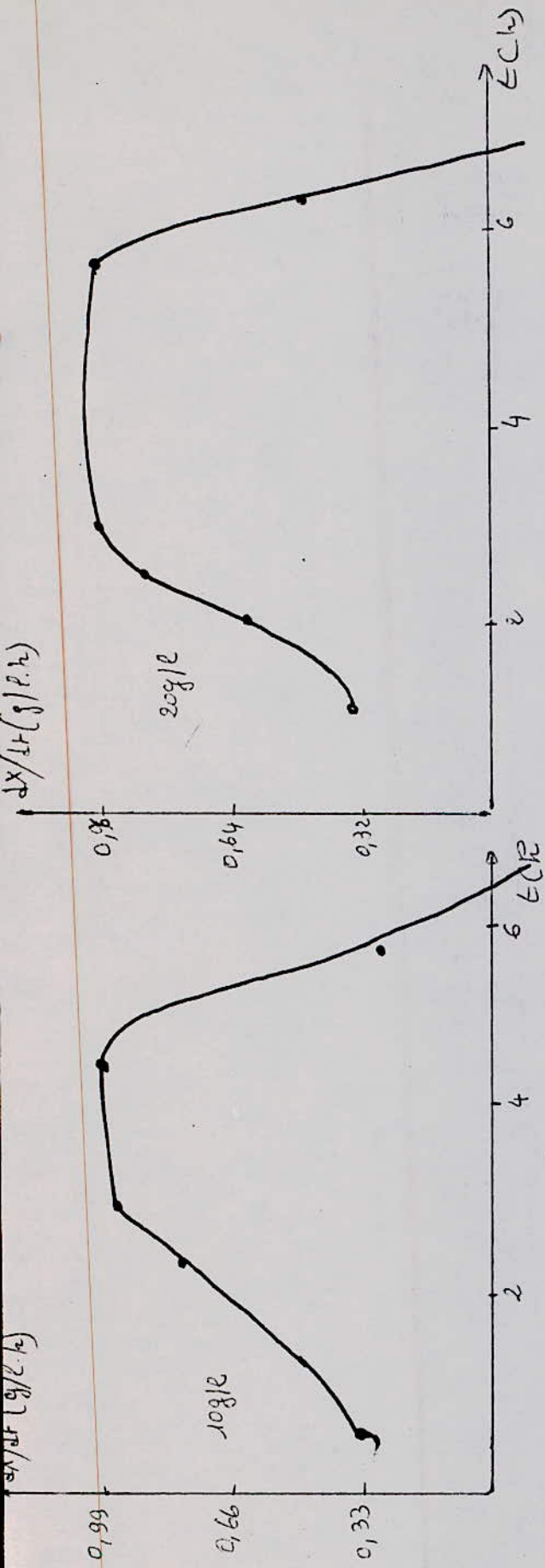


Fig: étude de l'activité en fonction du temps, en culture mixte.

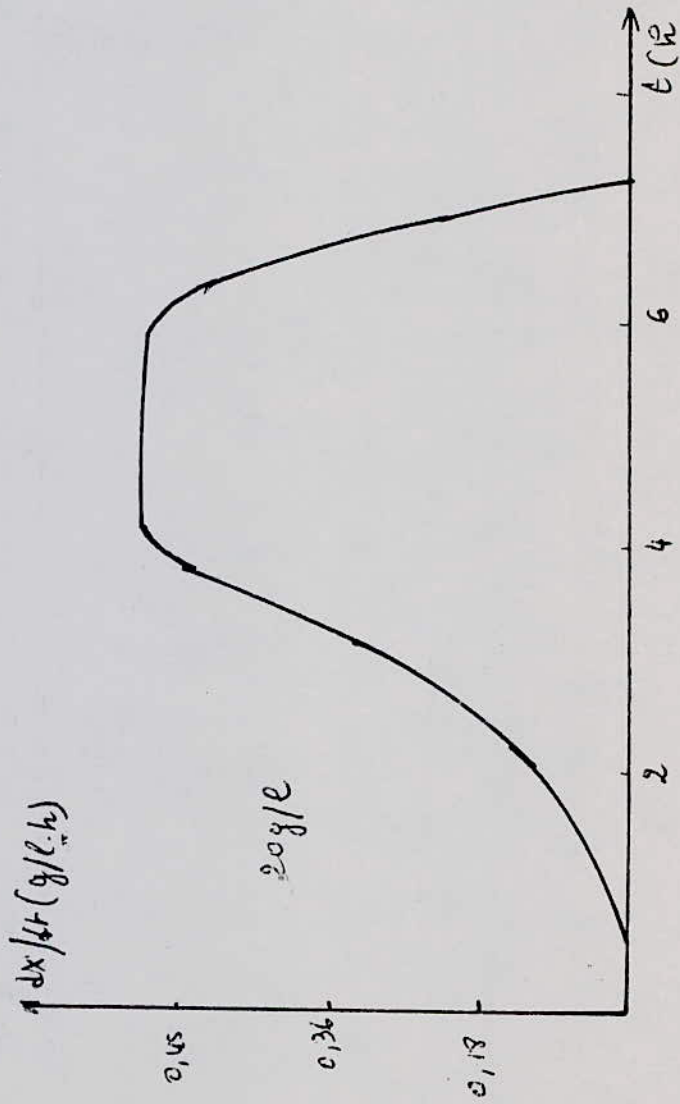
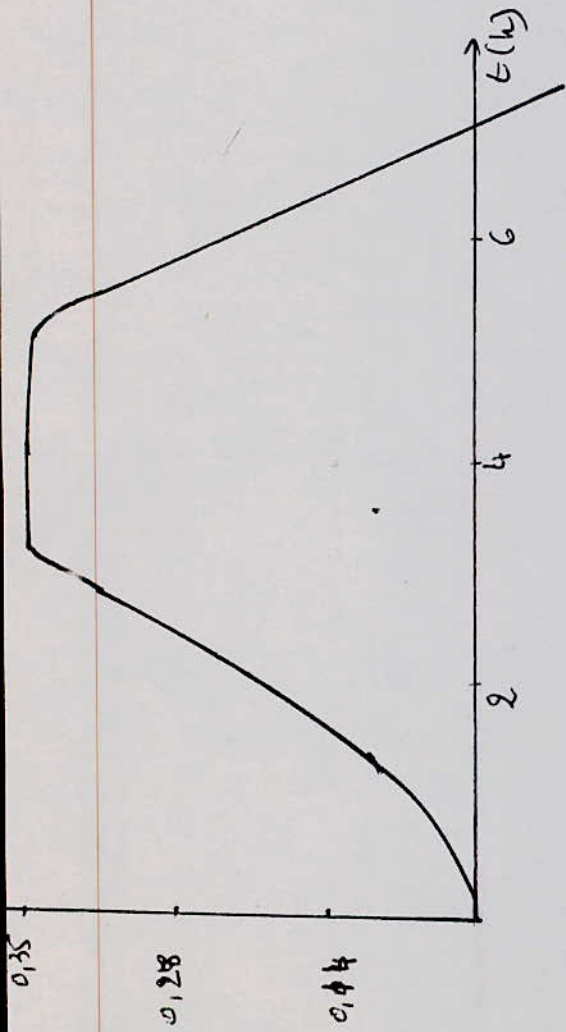
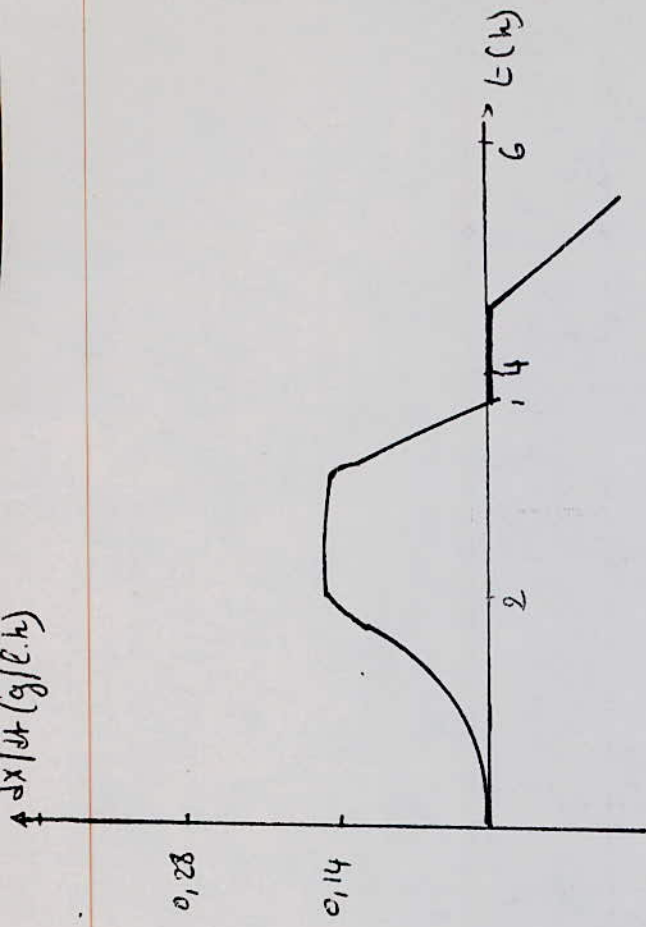


Fig 5: Etude de l'activité en fonction du temps, dans le cas de K.F

- Une phase stationnaire où $\frac{dX}{dt}$ atteint son maximum.
- Une phase de déclin dans laquelle l'activité diminue. On assiste alors à un arrêt de croissance cellulaire.
- A un moment donné, l'activité devient négative et traduit la lyse des cellules.

On voit par ailleurs que pour les deux cultures, on atteint la vitesse maximale à 20 g/l de lactose mais celle de la souche pure (0,65 g/l.H) est très faible comparativement au mélange de ferments (0,98 g/L.H).

4.3 PRODUCTION DE PROTEINES

Les fig.(7 et 8) nous donnent l'évolution de la production de protéines en fonction du temps puis en fonction des différentes phases de croissance.

Nous constatons que la teneur en protéines varie d'une phase à une autre.

Elle est maximale en phase exponentielle (52 % pour la culture mixte). D'autre part, la production des protéines évolue proportionnellement à la croissance cellulaire en fonction du temps. Elle est maximale dans le milieu M2 contenant 20 g/l de lactose.

A partir des fig.(9 et 10) nous avons essayé d'établir des équations donnant la quantité de protéines en fonction de la biomasse et qui sont:

<ul style="list-style-type: none"> - $P = 0,361 X$ pour la culture pure - $P = 0,520 X - 0,06$ pour la culture mixte - X: représente la biomasse en g/l - P: représente le taux de protéines en g/l

Nous remarquons que l'association des deux ferments donne un meilleur pourcentage en protéines (52 %). Ceci à notre sens est dû à deux raisons:

- La souche *Kluyveromyces Lactis* est plus riche en protéines que la souche *Kluyveromyces Fragilis*.
- La synergie qui existe entre les deux levures; une des souches synthétise les enzymes qui sont exploitées par l'autre.

4.4 MODELISATION

Les résultats exposés précédemment ont montré que les meilleures performances de croissance sont obtenues par l'utilisation de KF + KL.

Le modèle de la croissance cellulaire étant établi par MONOD, l'objectif de notre travail est de tester sa validité sur la culture mixte, en évaluant l'écart entre les valeurs expérimentales et celles fournies par le calcul à l'aide du modèle:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S}$$

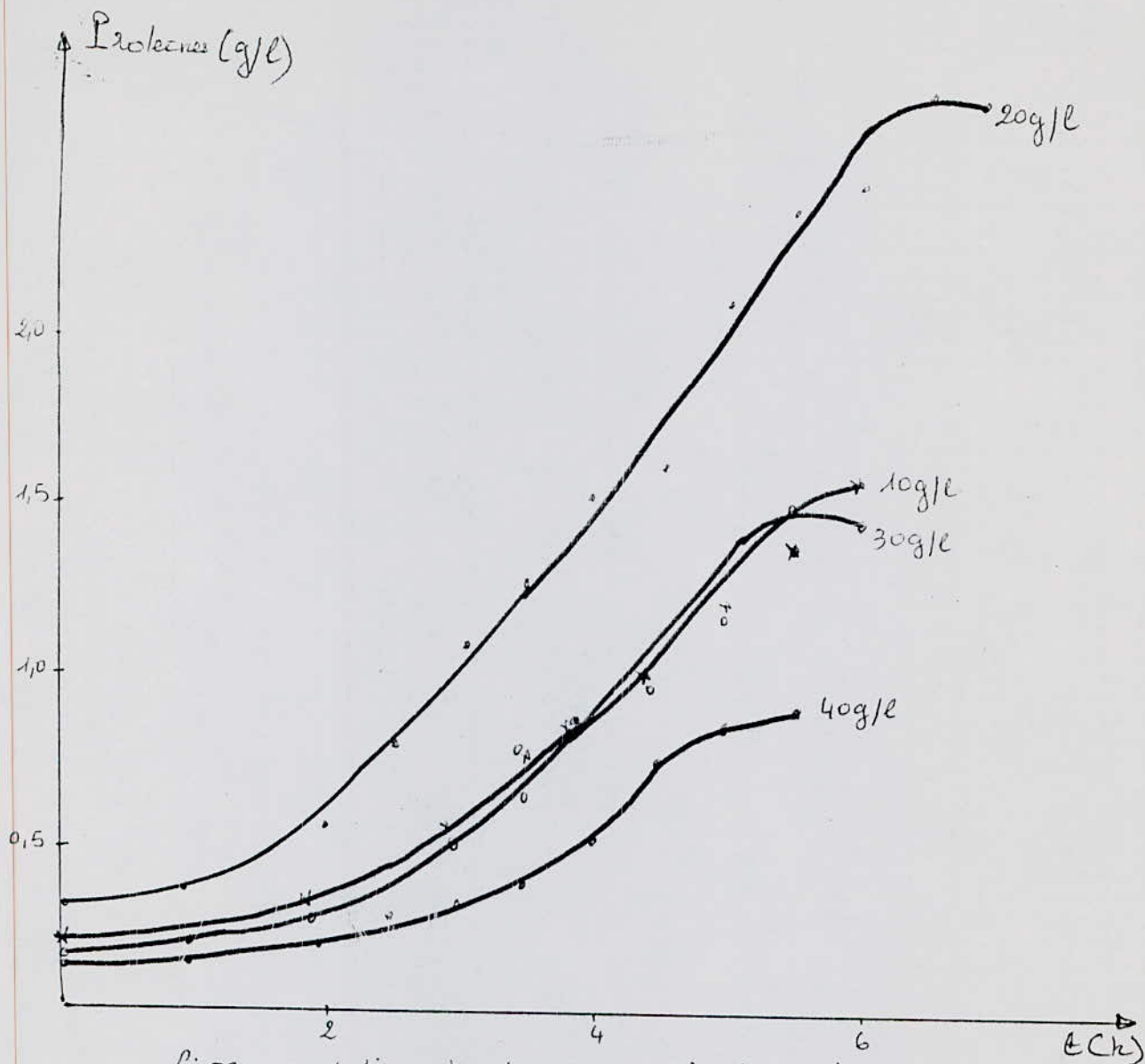


Fig 7: Evolution de la production de proteines en fonction du temps pour (K.F et K.L)

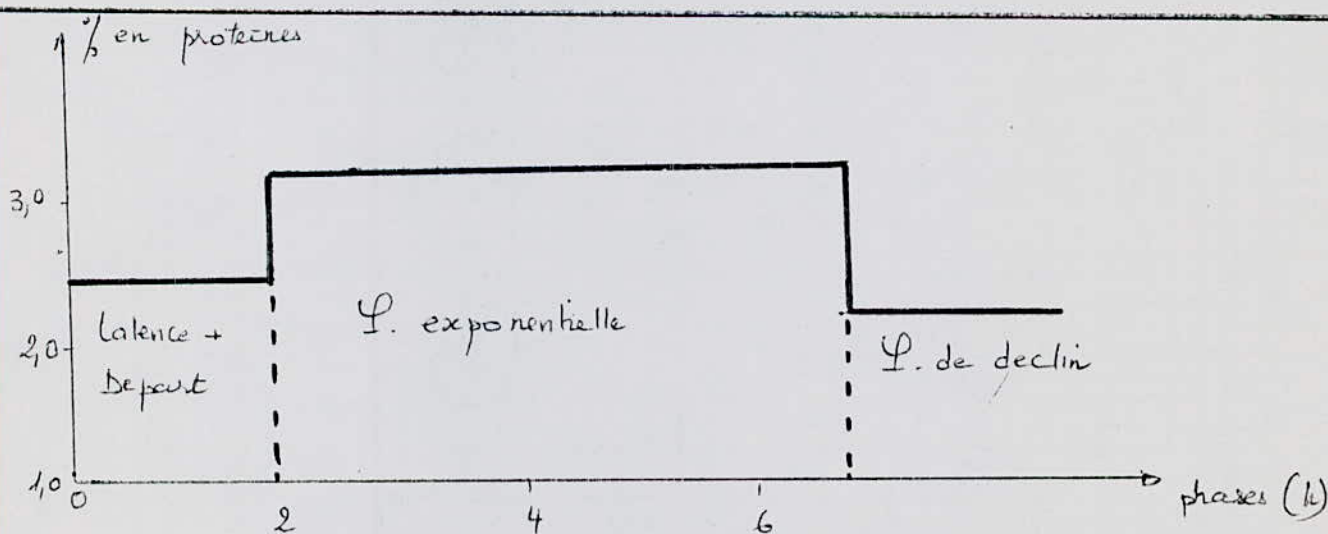


Fig 8: Variation du taux de proteines en fonction des differentes phases (P).

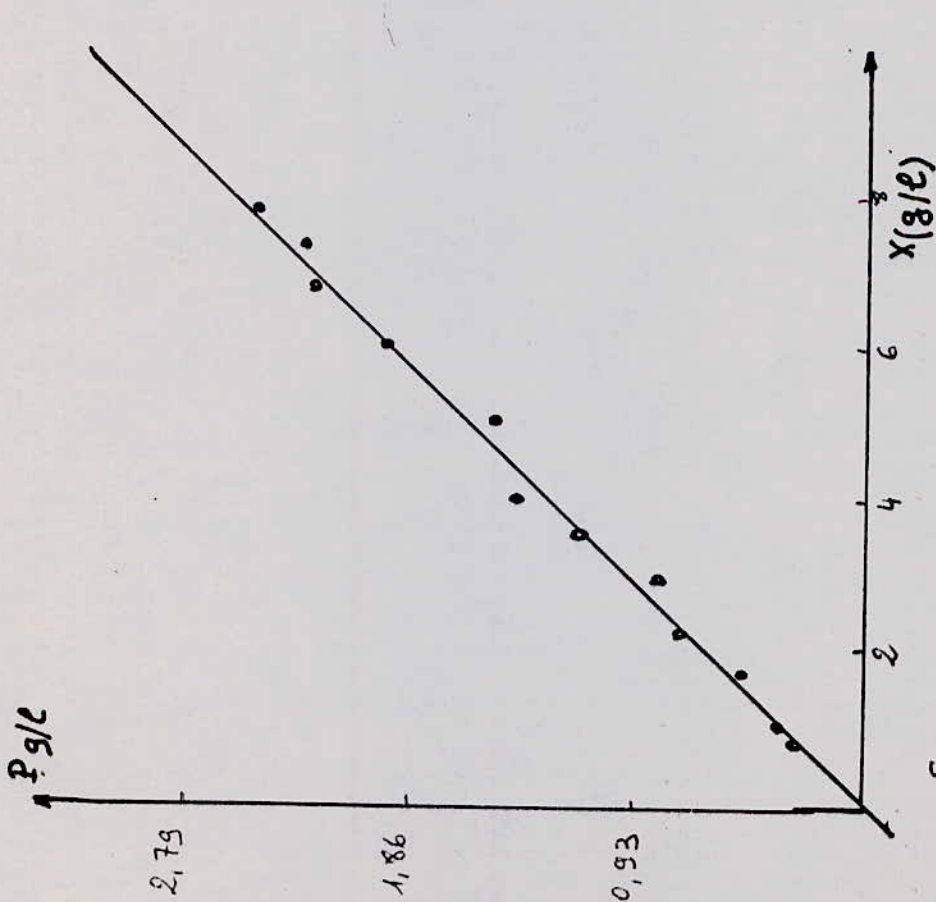


Fig 9: evolution de la production de protéines en fonction de la biomasse en culture mixte

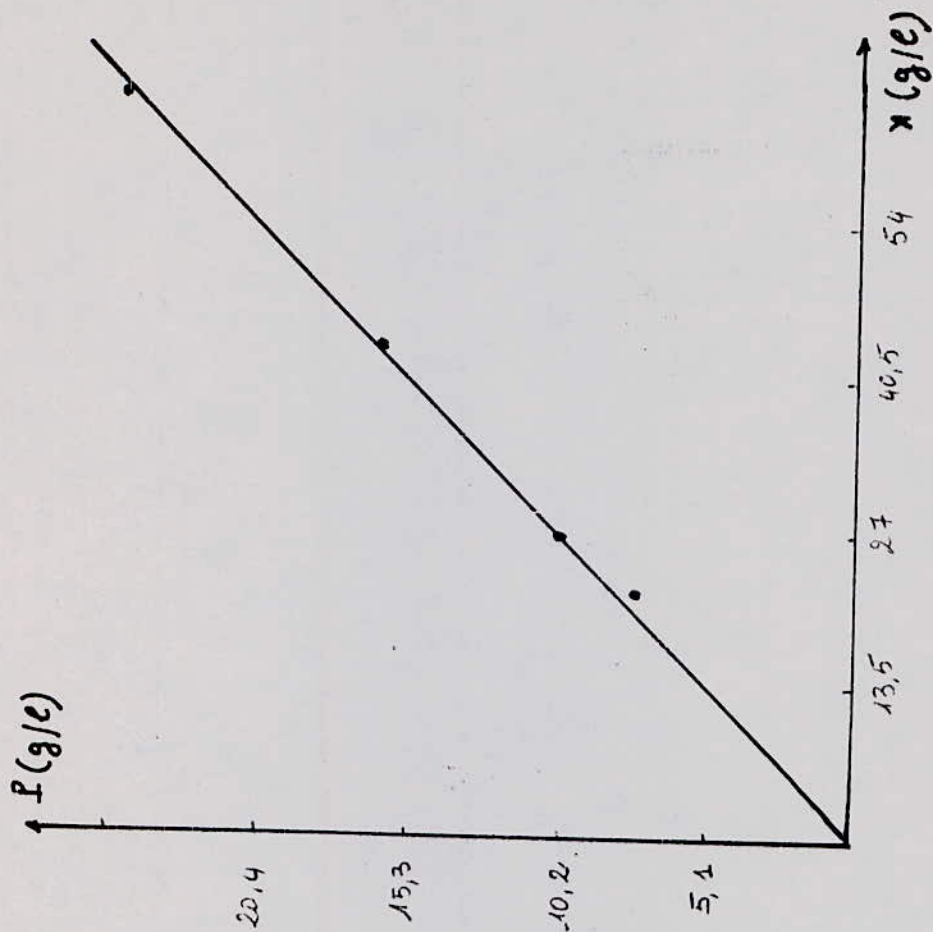


Fig 10 Evolution de la production de protéines en fonction de la biomasse en culture pure.

4.4.1 Détermination graphique de μ_{max}

Le taux maximal de croissance correspond à la pente constante : $\frac{d(\ln X)}{dt}$ pendant la phase exponentielle. Les valeurs sont consignées dans le tableau II. (Annexe)

A partir de la courbe de croissance en fonction de la concentration du substrat on détermine le taux maximal de croissance de ce type de culture.

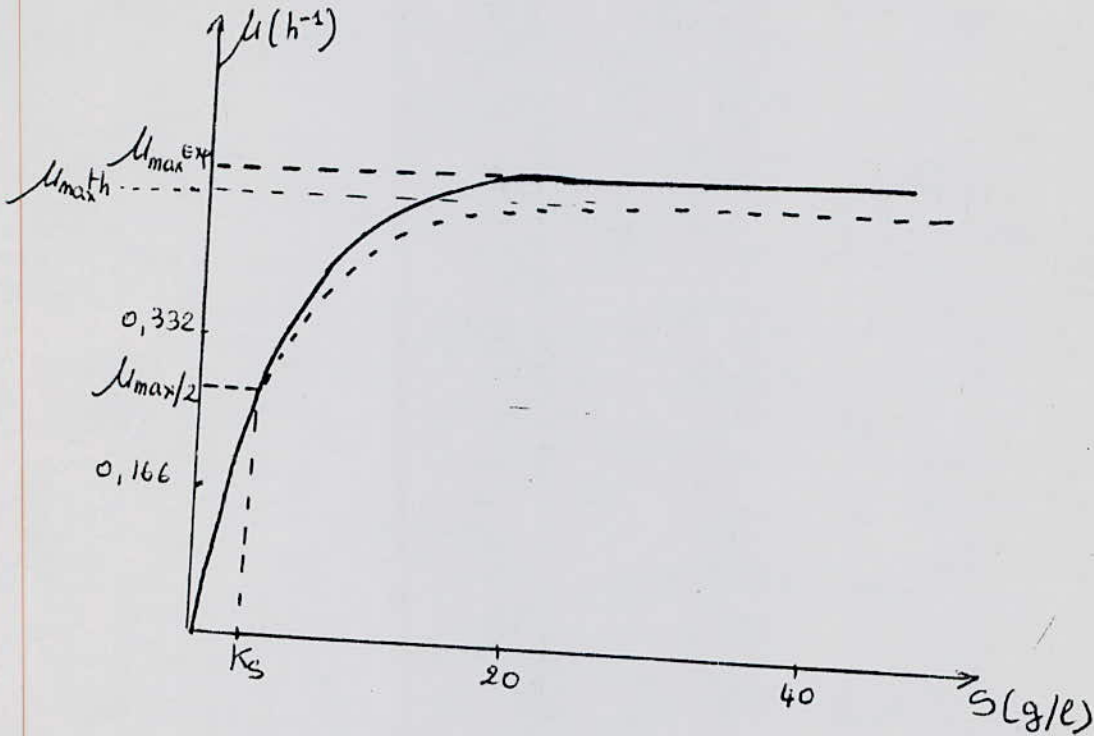


FIG 11.1: Variation du taux de croissance en fonction de la concentration du substrat

Nous avons trouvé: $\mu_{max}(exp) = 0,5 H^{-1}$

4.4.2 Détermination graphique de K_s

A partir de linéarisation de LINEWEAVER et BURK, l'équation de MONOD devient :

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

Le point d'intersection de la courbe $\frac{1}{\mu} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ avec l'axe des abscisses nous donne la valeur de K_s qui est:

$K_s = 2,21 g/l$

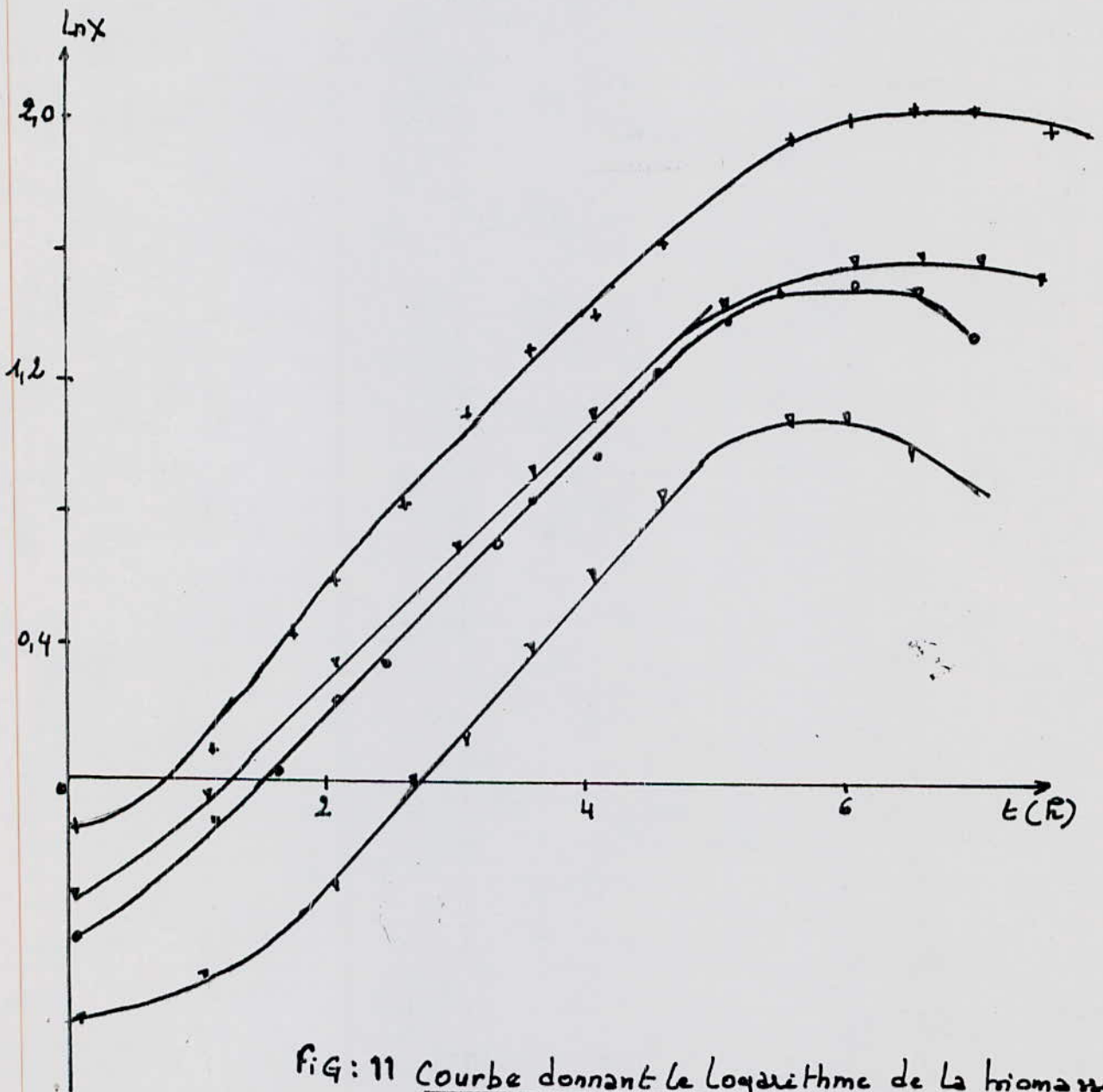


Fig: 11 Courbe donnant le Logarithme de La biomasse
en fonction du temps dans le cas de
 $F.K + K.L$

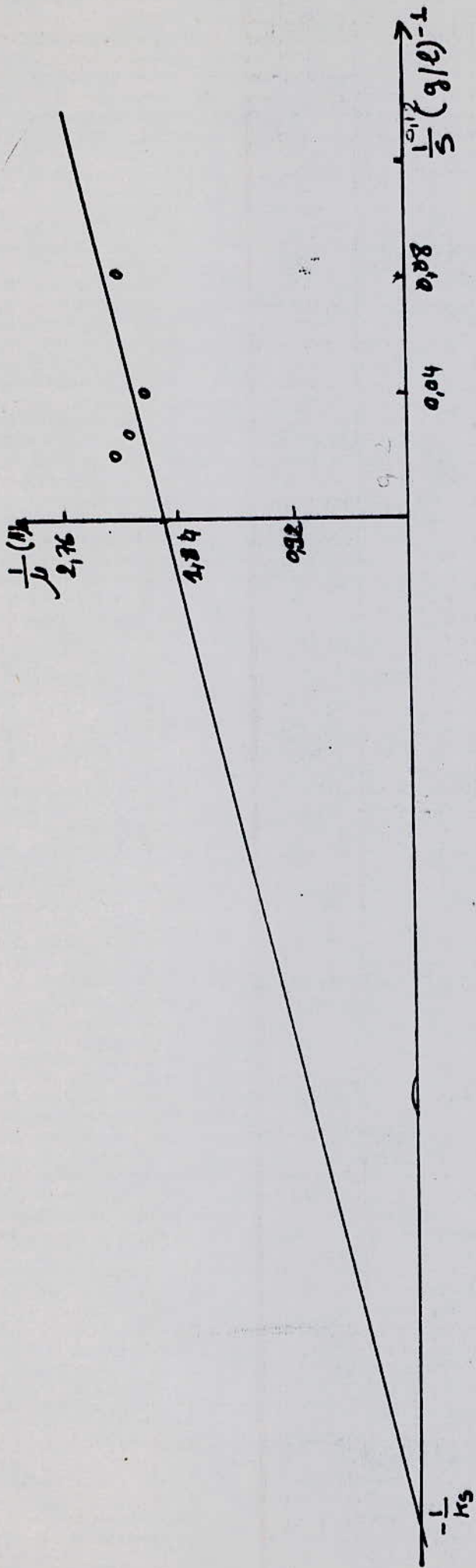


fig: 12 Détermination graphique de K_s

4.4.3 Calcul de μ à partir du modèle

En utilisant nos résultats expérimentaux, le modèle devient:

$$\mu_{th} = 0,50 \cdot \frac{S}{S + 2,21}$$

Le tracé de μ_{th} en fonction de S montre que les valeurs expérimentales ne sont pas trop écartées du modèle.

4.5 REMARQUES GÉNÉRALES

- La souche de levure Kluyveromyces Fragilis pousse mieux dans un milieu contenant 20 g/l de lactose mais il s'est avéré que la concentration maximale en biomasse est obtenue à 10 g/l de lactose.

- Les associations KF et KL semblent donner dans ce même milieu les meilleurs résultats ($\mu_{max} = 0,50 \text{ H}^{-1}$), probablement dus à une synergie entre les deux espèces.

- Le taux de protéines en culture mixte (52 %) est supérieur à celui d'une culture simple (36 %).

- La culture mixte suit le modèle de MONOD.

ooo

TRAVAIL EFFECTUE

OBJECTIF / FINALITES

Choix du mini fermenteur

- Avoir des résultats fiables.

utilisation des
Souches disponibles

- Préparation d'une fermentation.
à partir de KF et KL + K.F selon
les conditions de croissance :
($\text{pH} = 5$; $T = 35,5^\circ\text{C}$; Aération, agitation).

Recherche bibliographique
de la composition du milieu
de culture

- répondre aux exigences du
milieu de culture.

Expériences effectuées:

- 1 - Mesure de la turbidité
- 2 - dosage des protéines
- 3 - Matière sèche

(1+3) optimisation de la croissance
de K.F, K.L + K.F $\rightarrow X_{1\text{max}} = 2,74$; $X_{2\text{max}} = 7,75$
- modélisation de la cinétique
de KL + KF $\rightarrow \mu_{\text{max}} = 0,50 \text{ h}^{-1}$
 $K_s = 2,21 \text{ g/l}$

(1+2+3): taux de protéines en fonction
de la biomasse :
* 36% Pour KF
* 50% Pour KF + KL

Exploitation des résultats

- Comparaison entre une culture
Pure (KF) et la culture mixte (KF + KL)

C O N C L U S I O N S

Ce travail a répondu à mon sens à un certain nombre de questions susceptibles d'être posées à propos de la fermentation lactique.

Les diverses expériences entreprises à chaque étape de notre travail, ont montré que le mélange des ferments KL et KF a donné une meilleure optimisation de la croissance cellulaire que la culture pure et une bonne production de protéines. D'autre part, nous avons pu constater que la cinétique pour une culture mixte suit effectivement la loi empirique de MONOD.

Un tel procédé de valorisation présente un triple intérêt:

- Préserver l'environnement.
- Produire des protéines alimentaires.
- Développer l'économie du pays.

Cependant il reste beaucoup à faire dans le domaine de la biotechnologie à savoir:

- Contrôler la qualité microbiologique et biochimique des ferments.
- Déterminer la valeur nutritionnelle des levures produites.
- Faire une étude technico-économique d'un tel procédé.

ooo

ANNEXE

SOLUTION D'OLIGOELEMENTS

1 l

CuSO ₄ , 5H ₂ O	4,0 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2,8 g
NaMoO ₄ , 2H ₂ O	2,6 g
KI	2,6 g
H ₃ BO ₄	4,0 g

SOLUTION DES METAUX

1 l

MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,59 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,055g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0575 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0,017 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,022 g

TABLEAU II Cinétique de croissance

TABLEAU II 1: Cas d'une culture mixte

Substrat (g/l)	10	20	30	40
temps de latence	1,5	1,5	2	2,5
temps de départ(H)				
phase exponentielle (H)	2-5,5	1,75-5,75	2-5	2,75-4,
phase stationnaire (H)	6,25-7	6,5-7	5,75-6,25	5,25-6
max exp. (H ⁻¹)	0,43	0,48	0,45	0,49
X max (g/l)	4,95	7,75	4,64	3,04
t max pour avoir Xmax (H)	6,5	6,5	6	6
max th (H ⁻¹)	0,41	0,45	0,46	0,47

TABLEAU II 2: Cas d'une culture pure.

substrat (g/l)	10	20	30	40
temps de latence + temps de départ(H)	1,5	2,5	1	6
phase exponentielle (H)	2,75--5,5	3,25--6,5	1--2,5	-
phase stationnaire (H)	-	-	-	-
max experimental (H ⁻¹)	0,49	0,43	0,31	-
X max (g/l)	1,075	2,14	0,43	-
t max pour avoir X max	7,0	7	4	-

TABLEAU III ACTIVITE CELLULAIRE

TAB III 1: Cas de la culture mixte

S (10 g/l)		S (20 g/l)		S (30 g/l)		S (40 g/l)	
t(H)	dx/dt (g/lH)	t	dx/dt	t	dx/dt	t	dx/dt
0,5	0,33	1	0,32	0,75	0,17	1	0,23
2,25	0,78	2	0,63	1,75	0,44	2	0,46
3	0,93	2,75	0,94	3,5	0,86	3,5	0,75
4,5	0,96	3,5	0,98	5	0,92	4	0,88
5,5	0,25	5,5	0,96	5,75	0,22	4,5	0,68
6,25	0	6,25	0,50	6	0	5,25	0
7,30	-0,48	6,75	0	6,5	-0,65	5,5	-0,27

TAB III 2: Cas de la culture pure

S (10 g/l)		S (20 g/l)		S (30 g/l)	
t	dx/dt	t	dx/dt	t	dx/dt
0	0	0	0	0	0
0,75	0,033	1	0,072	1,5	0,07
2,5	0,24	3	0,18	2,3	0,14
3,25 -	0,40	4,25	0,65	3,75	0
5,25		-6		-4,5	
6	0,22	7	0,23	5,5	0,13
6,5	0,10			-7	

TABLEAU IV

Equation $P = f(X)$ relative à chaque phase de la culture mixte

Concentration en lactose (g/l)	Phase	Durée (H)	Equation
20	A-latence+démarrage	1,5	$P = 0,24 X + 0,51$
	B-exponentielle+stationnaire	4,5	$P = 0,37X - 0,06$
	C-déclin	1,0	$P = 0,34 X - 0,06$
30	A-	1,5	$P = 0,253 X + 0,011$
	B-	4,75	$P = 0,322 X + 0,000$
	C-	1,25	$P = 0,214 X + 0,375$
40	A-	3,15	$P = 0,281 X + 0,005$
	B-	3,00	$P = 0,37 X + 0,15$
	C-	1,15	$P = 0,333 X - 0,435$

B I B L I O G R A P H I E

1. CHAPEVILLE , H. CLAUSER; "BIOCHIMIE" HERMANN 1974
2. H.A HARPER, V.W RODWELL, P.A MAYES; "PRECIS DE BIOCHIMIE"
Les presses de l'université , LAVAL 1974
3. M^{elle} BOUZAR LINDA; projet fin d'étude; " Analyses microbiologiques
et biochimiques d'un concentrat proteique sanguin " 1989
4. J. MARTIN " INTRODUCTION A LA BIOCHIMIE " 1974
5. BUTRY " MANUEL DE TP DE BIOCHIMIE " Institut universitaire de thechno-
logie (I.U.T)
6. H.A HARPER, V.W RODWELL, " Précis de biochimie " 1982
7. JEAN DELAUWAY; " BIOCHIMIE " AERMAN Editeurs des sciences et des arts.
1988.
8. DAVID. T. PLUMER "INTRODUCTION AUX TCHNIQUES DE BIOCHIMIE "
Mc GRQW-HILL 1989
9. L. LETUTOUR " LYSINE, TRYP TOPHANE, THREONINE: La BIOTECHNOLOGIE AU
SERVICE DE L'ALIMENTATION ANIMALE " Revue 1989
10. R. HASER, J.C FONTECILLA. CAMPS; " STRUCTURE ET FONCTION DES PROTEINES
Revue BIOFUTUR (novembre 1987)
11. J.C. CHEFTEL, J.L.CUQ, D.LORIENT; " PROTEINES ALIMENTAIRES "
Technique et documentation LAVOISIER, 1985
12. J.C FONTECILLA; " CHIMIE FINIE ". Revue BIOFUTUR (Sept.1986)
13. FROBISHER, FUEST, " MICROBIOLOGIE CLINIQUE " Traduit et adapté par
ANDRE DECARTE. Les éditinss H.R.W. 1976
14. H.LECLERC, R.BUTTU AUX, J.GUILLAUME, P.WATTRE; " MICROBIOLOGIE APPLIQUE
2^e édition DOIN 1983
15. H.GIRARD, R.ROUGIEUX; " TECHNIQUE DE MICROBIOLOGIE AGRICOLE "
DUNOD, P ARIS 1967
16. RENE SCRIBAN " BIOTECHNOLOGIE " TECHNIQUES ET DOCUMENTATIONS LAVOISIER
3^e édition 1988
17. P.L.FREIZE, " LA LEVURE EN 1980 " Revue 1982
18. CL.FEVRIER; " LES ORGANISMES UNICELLULAIRES DANS L'ALIMENTATION DES
PORCINS " Revue 1985
19. SOUILAMA HENDA; THESE DE FIN D'ETUDES I.N.A " contribution à l'étude
de K. Lactis et K. Fragilis cultivés sur lactosérum " 1989
20. P.BIROLAUD; " LES LEVURES-ALIMENT, SOURCES DE PROTEINES "
Syndicat des produits de levures aliment 1970

21. " COLLOQUE INTERNATIONAL SUR LES P.O.U." Technique et documentation
LAVOISIER 1983
22. P.J. BROCARD " PROTEINES ET ALIMENTATION HUMAINE " Revue Sciences et
techniques N°29 1985
23. CLAUDE COSTES; " PROTEINES FOLIARES ET ALIMENTATION " INRA 1981
24. J.SENEZ; " PERSPECTIVES DES P.O.U A L'ECHELLE MONDIALE INTERNATIONALE "
Revue: La sucrerie française 1980
25. JF de la GUERRIVIERE; " UN EXEMPLE CONCRET EN MATIERE DE BIOTECHNOLOGIE
Industrie agroalimentaire (IAA) 1981
26. RIVIERES; " LES APPLICATIONS INDUSTRIELLES DE LA MICROBIOLOGIE " édition
MASSON et Cie 1987
27. WEILAUD, T.JOSTMAN " NONTINOIRE LICHE VERNEFUGON, MOLKE IN EINEEN
AIRIFT " Revue : Chemical engenering technology 56-1984

CC

