

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
INRS-EAU

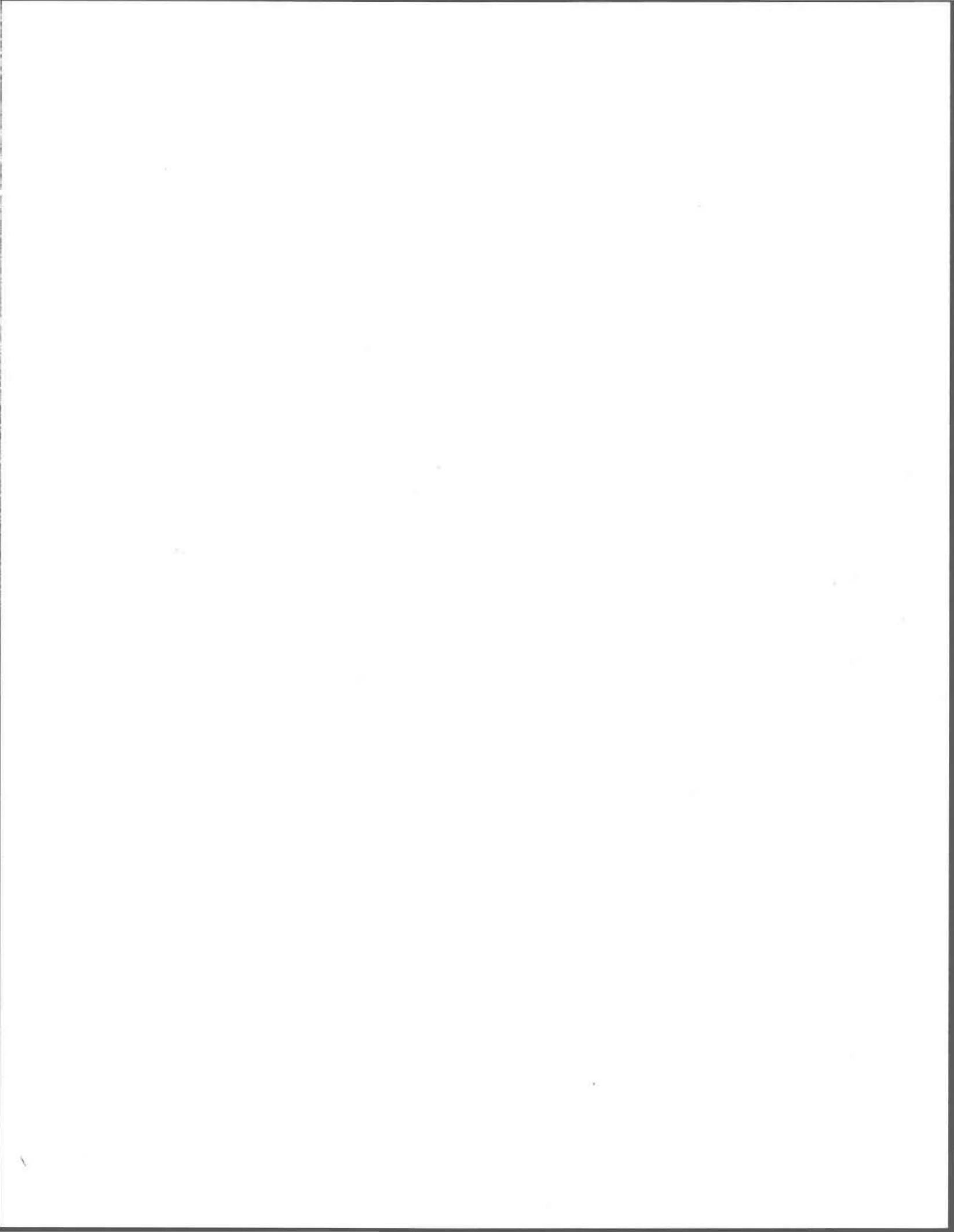
Mémoire
présenté
comme exigence partielle
de la maîtrise en sciences de l'eau

par

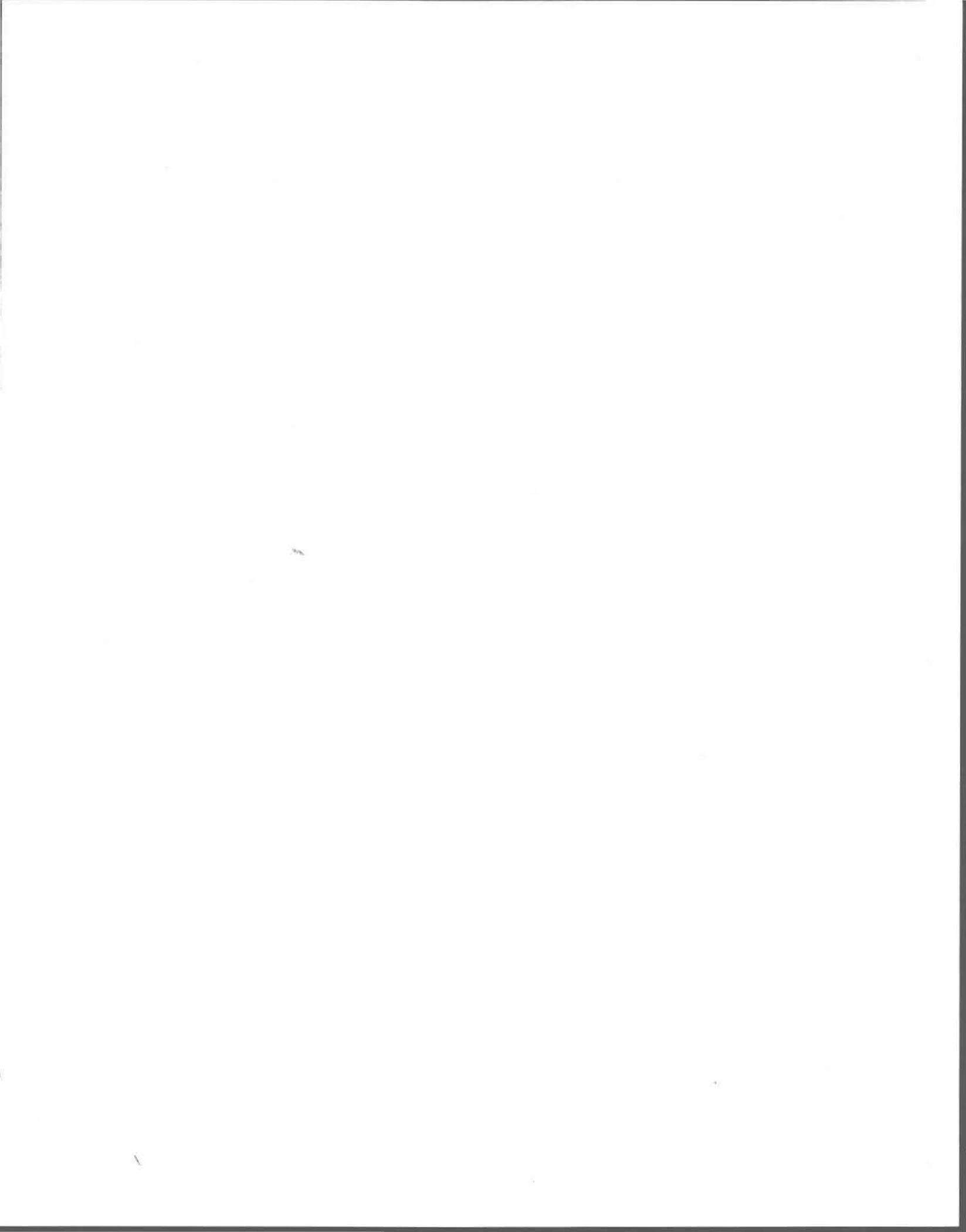
JALAL MZALI

Bioconversion de perméat de lactosérum par des cellules de
lactobacilles immobilisées sur un support solide

Juin 1992



Je dédie ce mémoire à ma mère Téba, à Chantal, Bouchra et Najat. Je les remercie d'avoir su m'encourager et me stimuler, ce qui m'a beaucoup aidé dans mon cheminement.



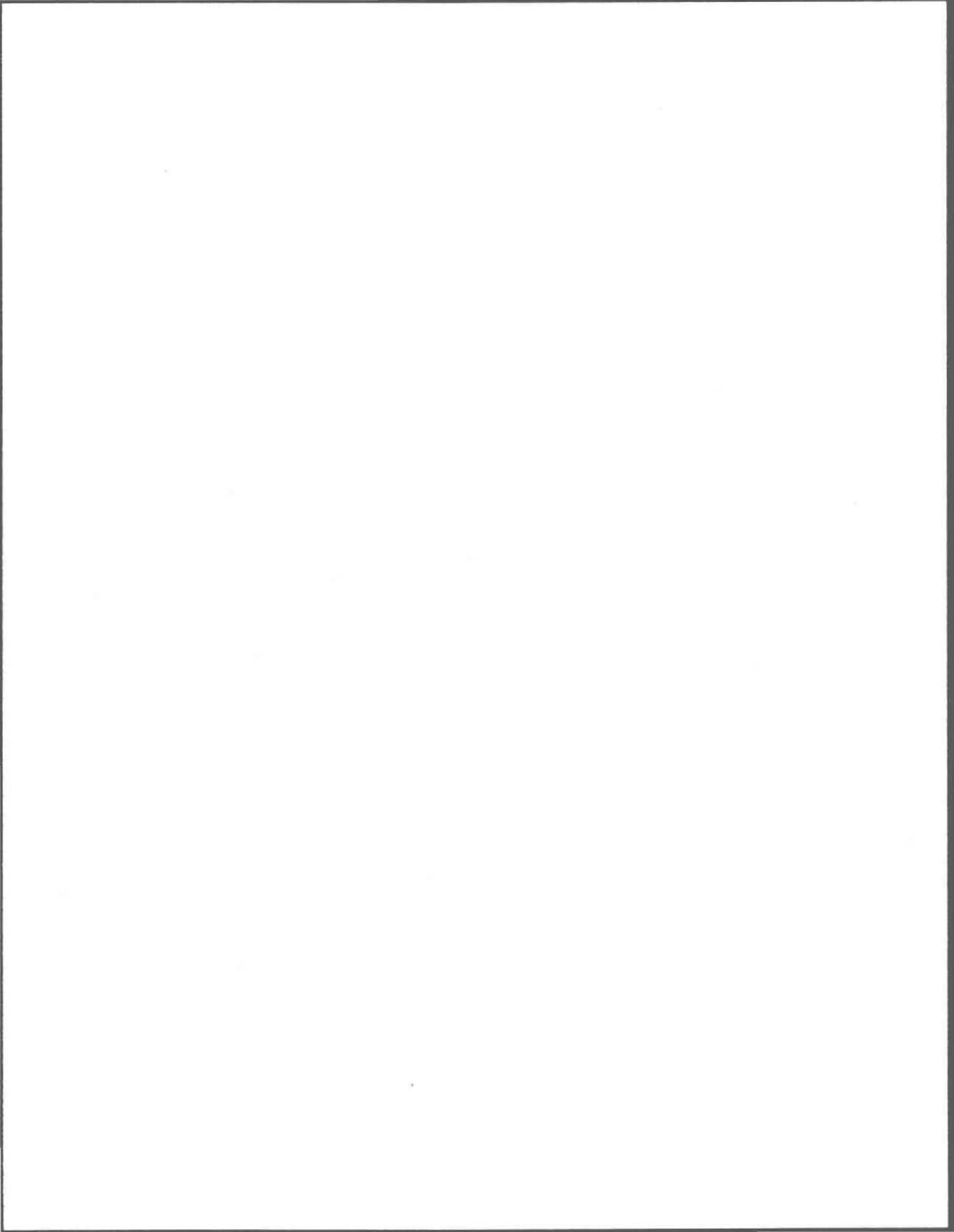
RÉSUMÉ

La valorisation du perméat de lactosérum par la bioconversion du lactose en acide lactique constitue une solution double pour la gestion de ce sous-produit laitier. Elle permet de satisfaire les attentes économiques de l'industrie laitière et de répondre aux exigences environnementales de la société. Dans cette optique, nous avons développé des bioréacteurs à lit fixe de lactobacilles immobilisées sur des copeaux de bagasse et opéré en continu en mode piston.

Des essais préliminaires de bioconversion de perméat par différentes souches de lactobacilles libres ont permis de retenir la souche *L. helveticus* ATCC 10797 et les deux souches de *L. bulgaricus* Hansen 2217 et *L. bulgaricus* ATCC 11842. Des essais d'optimisation des conditions d'immobilisation ont conduit au choix d'une température d'immobilisation de 5°C, d'un pH de 5-7 et une longueur du support de 1 cm.

Les bioréacteurs de *L. helveticus* ATCC 10797 et de *L. bulgaricus* Hansen 2217 immobilisés et sans contrôle de pH, ont permis d'obtenir une productivité maximale (basée sur le volume total du bioréacteur) de respectivement 17 et 19 g/l.h à un taux de dilution (D) = 1.3 h⁻¹ et une concentration maximale de lactate de 30 g/l respectivement aux taux de dilution (D)=0.2 et 0.3 h⁻¹.

L'addition de granules de CaCO₃ dans le lit fixe des cellules immobilisées a permis d'élever le pH de 3.5 à 4.9. Ce contrôle de pH a augmenté la concentration de lactate produit de 30 à 35 et de 30 à 38 g/l respectivement pour *L. bulgaricus* Hansen 2217 et *L. helveticus* ATCC 10797. L'augmentation de la productivité n'a été enregistrée que pour *L. helveticus* ATCC 10797 et qui a atteint 26 g/l.h au taux de dilution (D)= 1.5 h⁻¹ comparativement à 17 g/l.h au taux de dilution (D)=1.3 h⁻¹. Un rendement de bioconversion très élevé (0.98) a été obtenu pour tous les bioréacteurs testés. Les performances de ces derniers dépassent celles de la plupart des travaux similaires cités dans la littérature.



REMERCIEMENTS

À mon directeur du mémoire, le professeur R.D Tyagi, j'adresse mes profonds remerciements et mon entière reconnaissance, pour tout l'apprentissage dont il m'a fait don. Au delà de ses compétences scientifiques, ce sont ses grandes qualités humaines et son grand sens de l'humour que je veux saluer et remercier sincèrement. Sa disponibilité et ses encouragements ont été un leitmotiv pour dépasser les obstacles et réaliser ce projet. Je veux aussi remercier le professeur Kluepfel D., mon codirecteur pour les conseils pertinents qu'il m'a prodigués.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes sincères remerciements à l'Institut National de Recherche Scientifique-Eau, son directeur, le docteur J. P Villeneuve, et l'ensemble de son personnel, en particulier la secrétaire à l'admission, les techniciennes et techniciens du laboratoire et le personnel de la bibliothèque. Le cadre de travail sympathique et stimulant, ainsi que les moyens disponibles m'ont permis de réaliser mon projet qui me tenait à coeur dans les meilleurs conditions. La bourse d'études qui m'a été accordée m'a été d'une grande aide et m'a permis de me consacrer entièrement à mes recherches.

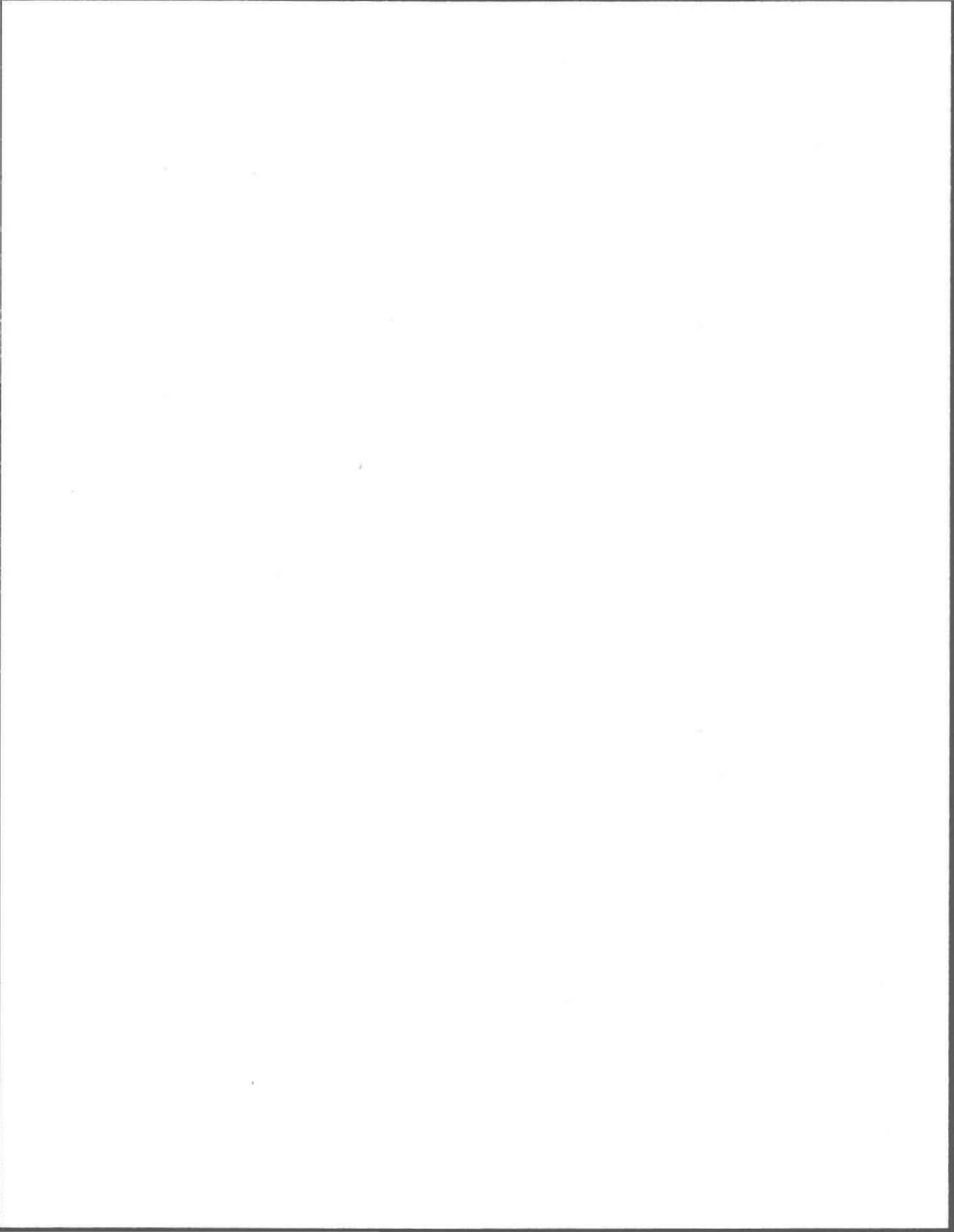


TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	III
INDEX DES TABLEAUX.....	VII
INDEX DES FIGURES.....	IX
INDEX DES PHOTOS.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES.....	XII

I) INTRODUCTION

1.2 PROBLÉMATIQUE.....	1
1.3 OBJECTIFS.....	3
1.1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
1.1.1 Les bactéries lactiques.....	3
1.1.2 Lactosérum et perméat.....	6
1.1.3 Production de l'acide lactique.....	11
1.1.3.1 Procédé discontinu ou "Batch".....	11
1.1.3.2 Procédé continu et cellules libres.....	12
1.1.3.3 Système à cellules immobilisées.....	15
1.1.4 Les supports.....	22



III) RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Support et cellules immobilisées.....	36
3.1.1 Analyse descriptive du système Support-Cellules immobilisées.....	36
3.1.2 Optimisation des paramètres d'immobilisation	41
3.2 Performances des cellules opérés sans contrôle de pH.....	48
3.2.1 Bioréacteur de cellules <i>L.bulgaricus</i> Hansen 2217 immobilisées sur bagasse.....	48
3.2.2 Bioréacteur de cellules <i>L. helveticus</i> ATCC 10797 immobilisées.....	51
3.2.3 Bioréacteur de cellules <i>L.bulgaricus</i> ATCC 11842 immobilisées.....	54
3.2.4 Comparaison des performances des trois Souches de lactobacilles immobilisées.....	59
3.3 Performances des bioréacteurs de lactobacilles immobilisées opérés avec un contrôle de pH.....	63
3.3.2 Cellules de <i>lactobacillus helveticus</i> ATCC 10797 immobilisées.....	64
3.3.2 Cellules de <i>lactobacillus bulgaricus</i> Hansen 2217 immobilisées.....	75
3.3.3 Comparaison des performances des deux souches de lactobacilles immobilisées.....	84
3.4 Évaluation de l'effet du contrôle de pH.....	85
3.5 Comparaison avec les résultats présentés dans la littérature.....	89
IV) CONCLUSION.....	96
V) SUGGESTIONS POUR DES TRAVAUX À VENIR.....	98
VI) BIBLIOGRAPHIE.....	100

VII) ANNEXE I	117
Résultats bruts des performances des cellules immobilisées opérées dans des bioréacteurs sans contrôle de pH.....	117
VIII) ANNEXE II	119
Résultats bruts des performances de <i>L. helveticus</i> ATCC 10797 immobilisé et opéré avec contrôle de pH.....	119
IX) ANNEXE III	124
Résultats bruts des performances de <i>L. bulgaricus</i> Hansen 2217 immobilisé et opéré avec contrôle de pH.....	124

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition chimique du lactosérum.....	8
Tableau 2: Composition du milieu MRS	26
Tableau 3: Composition du milieu Elliker.....	27
Tableau 4: Effet de la température sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.....	42
Tableau 5: Effet de la longueur sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.....	44
Tableau 6: Effet du pH sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.....	46
Tableau 7: Paramètres physiques et performances des trois bioréacteurs opérés sans contrôle de pH	58
Tableau 8: Paramètres physiques et performances des deux bioréacteurs opérés avec contrôle de pH.....	63
Tableau 9 : Comparaison des performances du contrôle de pH	86
Tableau 10: Performances de <i>L.bulgaricus</i> selon différents procédés tels que rapportés dans la littérature.....	90
Tableau 11: Performances de <i>L.helveticus</i> selon différents procédés tels que rapportés dans la littérature.....	93
Tableau 12: Résultats bruts des performances de <i>L.helveticus</i> ATCC 10797 sans contrôle de pH	118
Tableau 13: Résultats bruts des performances de <i>L.bulgaricus</i> Hansen 2217 sans contrôle de pH	118
Tableau 14: Résultats bruts des performances de <i>L.bulgaricus</i> ATCC 10842 sans contrôle de pH	118
Tableau 15: Résultats bruts des performances de <i>L.helveticus</i> avec contrôle de pH à $D= 0.33 \text{ h}^{-1}$	120
Tableau 16: Résultats bruts des performances de <i>L.helveticus</i> avec contrôle de pH à $D= 0.56 \text{ h}^{-1}$	121

Tableau 17: Résultats bruts des performances de <i>L.helveticus</i> avec contrôle de pH à D= 0.737 h ⁻¹	122
Tableau 18: Résultats bruts des performances de <i>L.helveticus</i> avec contrôle de pH à D= 1.48 h ⁻¹	123
Tableau 19: Résultats bruts des performances de <i>L.bulgaricus</i> avec contrôle de pH à D= 0.22 h ⁻¹	125
Tableau 20: Résultats bruts des performances de <i>bulgaricus</i> avec contrôle de pH à D= 0.33 h ⁻¹	126
Tableau 21: Résultats bruts des performances de <i>bulgaricus</i> avec contrôle de pH à D= 0.42 h ⁻¹	127
Tableau 22: Résultats bruts des performances de <i>bulgaricus</i> avec contrôle de pH à D= 0.50 h ⁻¹	128
Tableau 23: Résultats bruts des performances de <i>bulgaricus</i> avec contrôle de pH à D= 1.12 h ⁻¹	129

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Principales méthodes d'immobilisation des cellules.....	16
Figure 2: Le montage expérimental.....	30
Figure 3: Schéma de la colonne garnie.....	32
Figure 4: Profil du substrat consommé et produit formé sans contrôle de pH par <i>L. bulgaricus</i> Hansen 2217	49
Figure 5: Profil du % de conversion et de la productivité de <i>L. bulgaricus</i> Hansen 2217 sans contrôle de pH	50
Figure 6: Profil du substrat consommé et produit formé sans contrôle de pH par <i>L. helveticus</i> ATCC 10797	51
Figure 7: Profil du % de conversion et de la productivité de <i>L. helveticus</i> ATCC 10797 sans contrôle de pH.....	52
Figure 8: Profil du substrat consommé et produit formé sans contrôle de pH par <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842	54
Figure 9: Profil du % de conversion et de la productivité de <i>L. bulgaricus</i> ATCC 11842 sans contrôle de pH	56
Figure 10: Productivité spécifique des trois souches.....	61
Figure 11: Rendement des trois souches.....	62
Figure 12: Profil de lactate produit aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur par <i>L. helveticus</i> avec contrôle de pH.....	66
Figure 13: Profil de lactate produit aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur par <i>L. helveticus</i> avec contrôle de pH	67
Figure 14: Profil de la productivité aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur par <i>L. helveticus</i> avec contrôle de pH	70
Figure 15: Profil de la productivité aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur par <i>L. helveticus</i> avec contrôle de pH	71

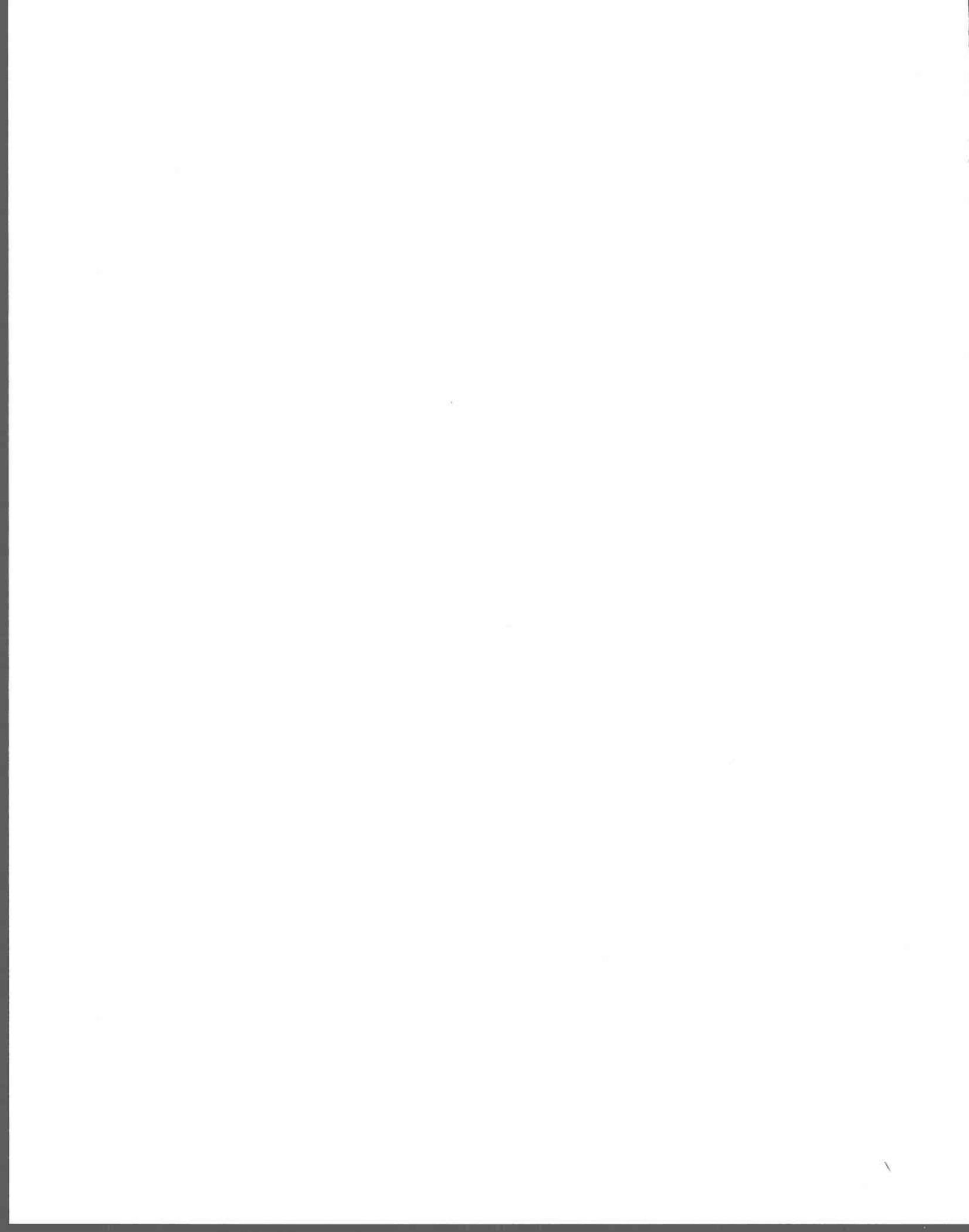
Figure16: Profil de lactate produit aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur par <i>L.bulgaricus</i> avec contrôle de pH	76
Figure17: Profil de lactate produit aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur par <i>L.bulgaricus</i> avec contrôle de pH.....	77
Figure18: Profil de la productivité aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur par <i>L.bulgaricus</i> avec contrôle de pH	80
Figure 19: Profil de la productivité aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur par <i>L.bulgaricus</i> avec contrôle de pH	81

INDEX DES PHOTOS

Photo 1: Ultrastructure du support de bagasse observée à un grossissement de 50 X.....	36
Photo 2: Ultrastructure du support de bagasse observée à un grossissement de 75X.....	37
Photo 3: Ultrastructure du support de bagasse observée à un grossissement de 1500X.....	38
Photo 4: Ultrastructure du support de bagasse observée à un grossissement de 3500 X.....	39

LISTE DES ABRÉVIATIONS UTILISÉES

- V_t (ml) : Volume total de la colonne vide
- V_r (ml) : Volume réactionnel = Volume total - Volume du support
- H (cm) : Hauteur de la colonne
- d (cm) : Diamètre interne de la colonne
- F (ml/h) : Débit du perméat pour l'alimentation du bioréacteur
- X_i (g) Quantité initiale de biomasse déterminée sur base humide
- S_i (g/l) Concentration initiale de lactose
- S (g/l) Concentration du lactose
- P_{max} (g/l) Concentration maximale d'acide lactique
- P_{sp} (g/l.g) Concentration spécifique de lactate P_{max} / X_i
- μ_{max} (h^{-1}) Taux de croissance spécifique maximal de la biomasse
- Y (g lactate/ g lactose) Rendement de la conversion
- D (h^{-1}) Taux de dilution calculé sur la base du volume total de la colonne V_t / F
- D_r (h^{-1}) Taux de dilution calculé sur la base du volume réactionnel de la colonne V_r / F
- Productivité volumétrique** (g/l.h) basée sur le volume total $P \times D$
- Productivité volumétrique** (g/l.h) basée sur le volume réactionnel $P \times D_r$
- Productivité spécifique** (g/l.h.g) basée sur la quantité de la biomasse $(P \times D) / X_i$
- Conversion max (%)**: Pourcentage de lactose convertit en acide lactique $100 \times (S / S_i)$





I) INTRODUCTION

1.1 PROBLÉMATIQUE

La quantité de lactosérum générée annuellement, estimée à partir de la production fromagère (Quantité de fromage produite multipliée par un facteur 8), est d'environ 68, 29 et 2.7 milliards de litres respectivement pour la Communauté Européenne (CEE), les Etats-unis et le Canada (F.A.O, 1990). Pour la même année, le Québec a produit 1.2 milliard de litres, soit 45 % de la production canadienne (Dupuis, 1990). Les quantités de perméat produites ne sont pas répertoriées, mais l'adoption de plus en plus généralisée de la pratique de l'ultrafiltration par l'industrie laitière (Maubois, 1988 ; Zall, 1988), ainsi que la croissance du marché des concentrés protéiques de lactosérum (FAO, 1990) laissent augurer la disponibilité prochaine de quantités comparables à celles du lactosérum. Au Québec, 35 % du lactosérum est sous forme de perméat (Lefebvre et Masella, 1990). Le problème de pollution posé par le perméat reste entier, car si son pouvoir polluant est légèrement plus faible (D.B.O₅ de 35 000 ppm versus 45 000 ppm) que celui du lactosérum, le déséquilibre de son contenu protéique l'associe plus fortement à un déchet comparativement au lactosérum.

L'éveil de la conscience environnementale de la société dans les années soixante-dix, a engendré des lois régissant le rejet de polluants dans la nature (Donwell, 1989). Ces lois se raffermissent de plus en plus en vue d'éliminer tout rejet de polluant dans les cours d'eau. Cette nouvelle contrainte et la reconsidération pour la haute valeur nutritionnelle des solides du lactosérum ont poussé l'industrie laitière et certaines agences gouvernementales à chercher et à développer un maximum de voies d'utilisation pour le lactosérum et le perméat.

Dans le schéma de la gestion du lactosérum (et du perméat) on le retrouve principalement sous deux formes : brute et transformée.

La forme brute représente jusqu'à 45 % du lactosérum total produit (Sanderson, 1985). Le lactosérum brut est retourné aux fermiers pour être utilisé dans l'alimentation du bétail et des porcs (Modler, 1988). Il peut être incorporé jusqu'à l'équivalent de 30 % de la matière sèche de la diète (Schingoete, 1976).

Cette utilisation est limitée par les coûts de transport qui ne peuvent être envisageables que pour une distribution dans un rayon de 40 km de l'usine (Tyagi, 1987). Son important contenu en azote, phosphore et potassium, son rapport carbone/azote élevé ainsi que l'absence de composés toxiques le caractérisent comme fertilisant et laissent envisager l'épandage comme une bonne utilisation. La percolation possible de l'azote vers les nappes souterraines et sa persistance constitue la principale réserve à l'acceptation de cette pratique à cause du caractère toxique que peut développer l'azote (Modler, 1988).

Le rejet dans les égouts municipaux ou directement dans les cours d'eau constitue la pratique la plus préjudiciable à l'environnement. Malgré une baisse drastique de cette pratique, une persistance demeure surtout chez les petites industries laitières (EPA, 1977).

La transformation du lactosérum suit trois voies majeures : la concentration, le fractionnement et la fermentation.

Le séchage du lactosérum sous forme de poudre constitue la voie principale de transformation du lactosérum en plus d'être la principale technique de concentration (Kosikowski, 1979 ; Mann, 1982 ; Adesso *et al.*, 1986). Elle s'applique à plus de 75% du lactosérum transformé (Mann, 1987). Le coût énergétique de cette pratique et la saturation de la demande pour le produit font que souvent le prix de vente ne rencontre pas le coût de production, ce qui réduit l'avenir de cette pratique surtout auprès des petites et moyennes industries.

Le fractionnement permet de récupérer sélectivement les deux constituants majeurs du lactosérum : protéines et lactose. La récupération de la fraction protéique constitue l'opération de valorisation du lactosérum la plus rentable grâce à la valeur ajoutée de cette fraction. Cependant, le problème de gestion lié au perméat de lactosérum généré représente un grand obstacle à l'épanouissement de cette pratique.

La fermentation représente une des solutions les plus prometteuses pour le problème du perméat de lactosérum et du lactosérum. Elle remplit la double fonction de réduire un problème de pollution tout en générant des produits ayant une plus-value économiquement rentable. La diversité des substances qui peuvent être produites (protéines, alcools, acides organiques, antibiotiques...) ainsi que les récents progrès des technologies de concentrations (ultrafiltration, osmose inverse) laissent entrevoir le florissement, dans un avenir proche, de l'utilisation de cette voie pour le traitement de ce milieu dilué de fermentation.

1.2 OBJECTIFS

L'objectif global de ce travail de recherche était de développer un bioréacteur de cellules immobilisées pour la bioconversion du perméat de lactosérum (lactose) en acide lactique. Ce bioréacteur doit avoir une bonne productivité en lactate, simple à opérer, efficace dans son rendement et économique pour être utilisable particulièrement par les petites industries laitières.

Les objectifs spécifiques étaient :

- Mettre au point une technique simple, rapide et efficace pour l'immobilisation d'une quantité élevée de lactobacilles homolactiques.
- Opérer en continu le système à cellules immobilisées dans un réacteur à lit fixe en mode piston, à température constante et sans contrôle de pH.
- Contrôler le pH du bioréacteur en opération afin d'augmenter sa productivité.
- Optimiser la hauteur du bioréacteur par rapport à son diamètre pour la production d'acide lactique.

1.3 BEVUE DE LITTÉRATURE

1.3.1 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques regroupent les genres Streptococcus, Pediococcus, Lactobacillus et Leuconostoc. Elles sont asporogènes, à coloration Gram positive, et produisent de l'acide lactique à partir de sucres fermentescibles, tolérant des pH acides. Elles sont anaérobies facultatives ou strictes et catalases négatives (Desmazeaud, 1983).

Les lactobacilles peuvent fermenter les sucres par des sentiers métaboliques différents. Ils génèrent des produits finaux pouvant être de l'acide lactique de façon exclusive, ou de l'acide lactique dans une proportion minimale de 50%. Dans le premier cas, il s'agit de lactobacilles homofermentaires, et hétérofermentaires dans le second cas.

Pour les lactobacilles homofermentaires l'équation globale de la réaction de catabolisme du lactose en acide lactique se résume à :



1 mole de lactose

4 moles de lactate

342 g de lactose

360 g de lactate

le rendement théorique ($Y_{p/s}$) de cette réaction de bioconversion est la quantité d'acide lactique générée par quantité unitaire de lactose consommé :

$$Y_{\text{Lactate/lactose}} = 360 \text{ g} / 342 \text{ g} = 1.05$$

Lactobacillus bulgaricus et *Lactobacillus helveticus* sont des bactéries lactiques homofermentaires capables d'utiliser directement le lactose pour produire du lactate.

Le transport du lactose à travers la membrane des cellules lactiques peut mettre en jeu soit un système dépendant du phosphoénol pyruvate (PEP) / phosphopyruvate (PTS), soit un système de perméases (Thompson, 1987). Le système PEP/PTS implique la phosphorylation du lactose lors de sa translocation à travers la paroi de la membrane et sa libération dans le cytoplasme sous forme de lactose phosphate. Une phospho β -galactosidase permet alors l'hydrolyse du lactose-phosphate en glucose et galactose 6-phosphate. Ce dernier suit la voie du D-Tagatose 6-phosphate pour produire du dihydroxyacétone phosphate et du glycéraldéhyde 3-phosphate qui réintègrent par la suite la voie glycolytique que le glucose suit directement. Le système de perméases libère du lactose non phosphorylé dans le cytoplasme. Le galactose résultant de l'hydrolyse du lactose par une β -galactosidase suit la voie de Leloir avant de rejoindre la voie glycolytique, alors que le glucose la suit directement (Kandler, 1983).

Pour *L. bulgaricus* et *L. helveticus*, le système de transport du lactose n'est pas défini de façon claire. Premi (1972) et Hemme (1981) ont rapporté la présence, chez ces deux cellules, de β -galactosidase et de la phospho β -galactosidase, suggérant la coexistence des deux systèmes de transport PEP/PTS et perméases. Les travaux récents de Hickey (1986) contredisent cette assertion puisqu'ils n'ont pas pu détecter d'activité relative au système PEP/PTS pour le transport du lactose chez *L. helveticus* et *L. bulgaricus*, suggérant l'utilisation unique du système de perméases.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes particulièrement exigeants en nutriments comprenant les glucides, protéines, vitamines et minéraux (Lawrence et Thomas, 1976 ; Accolas et al., 1980 ; Desmazeaud, 1983 ; Cogan, 1984)

En l'absence de sucres fermentescibles, les bactéries lactiques ne se développent pas. Elles les utilisent pour produire l'énergie nécessaire à leur croissance et produire de grandes quantités de lactate. Les deux espèces *L. helveticus* et *L. bulgaricus* sont caractérisées par leur capacité de fermenter un nombre restreint de sucres comparativement à *L. lactis* (Accolas, 1982). Les deux espèces fermentent le glucose, lactose et galactose. Ces trois sucres mis à part,

L. helveticus peut aussi fermenter le maltose (lentement), alors que *L. bulgaricus* peut fermenter le fructose (Dellaglio, 1988).

L'incapacité de ces cellules à synthétiser des acides aminés à partir de sources d'azote plus simples (Desmazeaud, 1983) rend l'apport exogène de protéines indispensable. Le rôle des peptides dans la stimulation de la croissance des bactéries lactiques, particulièrement les lactobacilles, est connu depuis longtemps (Merrifield et Wooley, 1958). Thomas (1969,1981) a pu démontrer le rôle particulier que jouent les peptides de poids moléculaire inférieur à 1500 daltons dans la croissance des streptocoques.

L. helveticus et *L. bulgaricus* exigent les suppléments vitaminiques communs à toutes les espèces de lactobacilles, telles le calcium pantothénate et la niacine. Ils ont besoin en plus de la riboflavine ; alors que *L. helveticus* exige aussi du pyridoxal (Rogosa, 1974 ; Desmazeaud, 1983).

Les lactobacilles exigent la présence de bases azotées telles l'adénine, la cystidine, la désoxyguanosine, la guanosine, la thymidine et l'uracile à des concentrations de 0.05 g/L dans les milieux synthétiques (Ledesma et al., 1977). Leur rôle dans la stimulation de la production de lactate dans le lait par *Streptococcus lactis* a été mis en évidence par Selby (1975).

Le rôle précis des minéraux dans la nutrition des bactéries lactiques n'est pas très bien connu (Desmazeaud, 1983). Il a été cependant montré que les ions manganèse, magnésium et fer jouent un rôle important dans la nutrition des Lactobacilles (Ledesma et al., 1977). Le magnésium stimule la croissance des cellules (Amouzou et al., 1985), le fer est impliqué dans différentes activités métaboliques (Archibald, 1986), alors que le manganèse joue un rôle particulier dans la résistance des lactobacilles à l'oxygène (Boyaval, 1989). Le rôle du calcium semble moins net (Koning et Otto, 1983), cependant l'ATPase membranaire qui joue un rôle primordial dans le métabolisme énergétique est stimulée par le magnésium et le calcium. Le potassium est nécessaire à la croissance de nombreuses espèces bactériennes et joue un rôle important dans le contrôle du pH intracellulaire (Tempest et Wouters, 1981). Les métaux lourds tels le cadmium, césium, cuivre, zinc, nickel, plomb et mercure ont généralement un effet inhibiteur sur les bactéries lactiques, exception faite du cobalt qui est nécessaire pour certaines espèces (Boyaval, 1989)

Le rôle des acides gras dans la nutrition des bactéries lactiques est encore moins bien défini que celui des minéraux. L'inhibition par l'acide oléique et l'acide caprique a cependant déjà été mise en évidence (Poznanski *et.al.*, 1968).

1.3.2 Lactosérum et perméat

La fraction liquide qui se sépare du caillé lors de la fabrication du fromage ou de la caséine, constitue un sous-produit appelé lactosérum (Alais, 1984 ; Law, 1984). Lorsque ce dernier est déprotéiné, il est appelé perméat de lactosérum (Cotton, 1988).

Le lactosérum est très fermentescible et fragile. Il représente 85 à 90 % du volume de lait utilisé (Guidini *et.al.*, 1984). Il a une haute valeur nutritionnelle car il retient 52 et 73% des éléments nutritifs du lait lorsqu'il provient, respectivement, de la fabrication des fromages cheddar et cottage (Knopp, 1989). Il représente essentiellement une source d'énergie et de carbone de part son contenu élevé (75% de la matière sèche) en lactose (Kennedy et Cabral, 1985). D'autres éléments de valeur s'y retrouvent, dont les protéines (10% de M.S), le calcium (0.45% de M.S), le phosphore (0.40% de M.S) et les vitamines hydrosolubles, sont les plus importants (Modler, 1988).

La composition du lactosérum et du perméat, varie directement avec la technologie utilisée lors de la transformation du lait (Moulin *et.al.*, 1984). Cependant, trois grandes classes de lactosérums peuvent être discernées soient :

- Le lactosérum doux provenant de la fabrication de fromages à pâtes cuites et à pâtes pressées.

- Le lactosérum acide provenant de la fabrication de caséine acide et de fromages à pâtes fraîches et pâtes molles.

- Le lactosérum déprotéiné ou perméat provenant de la fabrication de concentrés protéiques.

Tableau 1 : Composition chimique moyenne de différents lactosérums et perméat telle que rapportée dans la littérature.

<u>Paramètres</u>	<u>Lactosérum doux</u>	<u>Lactosérum acide</u>	<u>Perméat de lactosérum</u>	<u>Références</u>
pH	6.10	4.70	6.10	Modler, 1988
Matière sèche (%)	6.88	6.58	5.7	Moulin <i>et.al</i> , 1984
Lactose (%)	5.18	4.52	4.9	Moulin <i>et.al</i> , 1984
Protéine (%)	0.60	0.53	0.01	Hargrove, 1976
Gras (%)	0.25	0.05	<0.01	Hargrove, 1976
Lactate (%)	0.15	0.61	0.15	Smoragiewiecz, ⁸⁶
Cendres (%)	0.5	0.8	N.D	Kosikowski, 1977
<i>Minéraux</i>				
<i>(mg/100 g)</i>				
Calcium	45	103	136	Modler, 1988
Phosphore	40	78	73	Modler, 1988
Magnésium	8	10	N.D	Modler, 1988
Potassium	144	142	N.D	Scott, 1989
Zinc	N.D	N.D	N.D	
Fer	600	800	N.D	Modler, 1988
Sodium	50	50	50	Modler, 1988
<i>Vitamines</i>				
<i>(µg/ 100 g)</i>				
C	900	N.D	N.D	Scott, 1989
Thiamine	40	N.D	N.D	Scott, 1989
Pantothénate	360	360	360	Scott, 1989
Ribloflavine	150	150		Scott, 1989
B6	50	N.D	N.D	Glass <i>et.al</i> , 1977
B12	240	250	N.D	Glass <i>et.al</i> , 1977
Biotine	57	41	N.D	Glass <i>et.al</i> , 1977
Folate	4	N.D	N.D	Glass <i>et.al</i> , 1977

N.D = Non Déterminé

Le perméat de lactosérum, tel quel, représente un milieu nutritif déséquilibré pour la croissance des lactobacilles (Voir composition au tableau 1).

C'est essentiellement un milieu très dilué de lactose et de cendres. Il présente un rapport C/N de (200:1), ce qui met en évidence sa pauvreté en protéines. En tenant compte du rôle essentiel que jouent les protéines dans le métabolisme des lactobacilles, leur absence constitue l'handicap majeur du perméat de lactosérum en tant que milieu complet de croissance. L'absence de niacine, riboflavine, pyrodoxal, thiamine, biotine et vitamines B 6 - B 12, réduisent son contenu vitaminique en pantothénate, ce qui diminue d'autant sa valeur nutritive. Il est dépourvu de minéraux ayant un rôle important dans la croissance des lactobacilles tels le fer, le manganèse, le magnésium et le potassium. Son contenu minéral se limite au calcium, phosphore et sodium.

L'utilisation du perméat de lactosérum en tant que milieu de croissance et de fermentation requiert sa supplémentation en nutriments pour palier à ses carences protéiques, vitaminiques et minérales.

Diverses sortes de suppléments ont été utilisées dans le lactosérum et le perméat de lactosérum lors de la fermentation lactique. Des peptones, caséines, nitrates de potassium et nitrates d'ammonium ont été testés à 0.02 et 0.04 % comme suppléments protéiques dans du lactosérum au cours de sa fermentation par *L.bulgaricus* (Tewari et al., 1985). Du tourteau de grains de moutarde et de castor a été aussi utilisé conduisant à une légère amélioration de la quantité de lactate produit. Ceux sont les peptones, utilisées comme suppléments protéiques, qui ont donné les meilleurs résultats. Ce fait concorde avec la théorie rapportée dans la littérature (Cogan, 1980 ; Desmazeaud, 1983) . Les lactobacilles sont en effet incapables de synthétiser leurs acides aminés à partir d'éléments simples tels les nitrates. Ils utilisent beaucoup mieux des peptides tels les peptones comparativement à des protéines entières telles les caséines qui nécessitent une hydrolyse préalablement à leur transport vers l'intérieur de la cellule. De l'extrait de levure (E.L), de la liqueur de maïs (L.M) et du tryptone (T) ont été testés pour comparer leurs attributs comme source d'azote et facteur de croissance au cours de la fermentation de perméat de lactosérum par *L. helveticus* (Roy et al, 1986). Les E.L et L.M ont donné des résultats similaires à des concentrations de 0.5 %. La L.M ne peut être utilisée à des concentrations supérieures à 0.5 % à cause d'effets toxiques, alors que le E.L a pu être utilisé à la concentration de 1.5 % ce qui a permis de doubler la productivité maximale. Le tryptone a donné des résultats inférieurs aux deux suppléments et cela pour toutes les concentrations.

Aeschlimann (1990) a montré que la supplémentation du perméat de lactosérum par de l'extrait de levure lors de sa fermentation par *L. helveticus* a un effet significatif sur la concentration d'acide lactique, la productivité volumétrique et la conversion du substrat, mais pas sur le rendement du lactate. La productivité de *L. helveticus* est ainsi passée de 2 à 9 g/l.h lorsque la concentration de E.L a été utilisée à 2.5% au lieu de 0.15%. L'extrait de levure a un effet stimulant égal sur la croissance cellulaire et sur la production d'acide lactique (Pette *et.al.*, 1950 ; Bergère *et.al.*, 1968 ; Valles *et.al.*, 1968 ; Aeschlimann *et.al.*, 1990). Ses principaux éléments actifs seraient d'après Smith (1975), les acides aminés et à un moindre degré, les bases pyrimidiques et quelques minéraux. Pour Chazaud et Larpent (1980), c'est la teneur élevée en azote soluble, dont 50% sous forme d'acide aminés libres ainsi que l'ensemble des vitamines du groupe B, les oligo-éléments et les facteurs de croissance qui confèrent à l'extrait de levures son importance en tant que supplément nutritif.

1.3.3 Production de l'acide lactique

Le procédé "Batch" ou discontinu représente la technologie dominante pour la bioconversion du lactosérum en acide lactique à l'échelle industrielle (Roy et al., 1986 ; Linko et Linko, 1984 ; Mehaia et Cheryan, 1987)

En 1937, Burton a décrit la fermentation de lactosérum pasteurisé par un mélange de *L. bulgaricus* et un mycoderme favorisant une production plus vigoureuse d'acide lactique par *L. bulgaricus* grâce à l'action symbiotique du mélange. La propagation de l'inoculum a été réalisée par des transferts quotidiens jusqu'à l'atteinte d'un volume final de 17500 litres. La fermentation a été complétée après 42 heures d'incubation à 43°C avec un pH maintenu constant par addition périodique (6 heures) de lime.

Campbell (1953) est arrivé au même résultat en utilisant une souche pure de *L. bulgaricus*. La supplémentation du milieu avec 0.65 % de liqueur de maïs lui a permis de réduire la durée de la fermentation de près de la moitié. Un rendement aussi élevé que 90 % a été atteint. Le pH était maintenu constant par addition de carbonate de calcium, ainsi que la température à 43°C.

L'utilisation d'un inoculum *L. bulgaricus* à 2.5% (Reddy et al., 1976) au lieu d'un volume courant de 10% (Campbell, 1953 ; Arnott et al., 1958 ; Bechtle et Claydon, 1971 ; Bernstein et Everson, 1973), a permis de réduire considérablement les étapes et le volume des fermentations utilisées pour la propagation de la culture. L'absence de contamination et le maintien de la même vitesse de fermentation, malgré la réduction du volume de l'inoculum, s'est traduit par des avantages techniques et économiques.

Les milieux utilisés pour la propagation d'inoculum de lactobacilles peuvent avoir un impact sur leurs performances en terme de croissance, de production de lactate et de leur productivité, lors de la fermentation lactique du perméat de lactosérum (Tyagi et al., 1990). La propagation de *L. helveticus* dans un milieu lait écrémé a donné les meilleurs résultats comparativement à des milieux synthétiques de lactose et de glucose (Roy et al., 1986). Le milieu synthétique de lactose représenterait cependant une bonne alternative lorsqu'un milieu moins turbide que le lait est requis.

L'effet de la concentration initiale du lactose sur l'activité fermentaire de *L. helveticus* a été étudié en système discontinu par Aeschlimann (1989). Des concentrations de 60 à 240 g de lactose par litre de perméat (supplémenté à 0.5 % d'extraits de levures et à 0.02 % de peptones) ont été utilisées sans qu'il y ait d'inhibition liée au substrat. La productivité maximale de 3.7 g/ l.h est demeurée inchangée pour des concentrations de lactose allant jusqu'à 180 g/ l., et ce n'est qu'à une concentration de 240 g/ l que la productivité a baissé à 2.5 g/ l.h. Cette baisse est attribuable à la déplétion des facteurs essentiels et à l'inhibition due au lactate, non pas à une inhibition due au substrat.

Reddy et al. (1976) rapportent une concentration maximale de 70 g/ l de lactose, qui peut être utilisée complètement par *L. bulgaricus* lors de la fermentation de lactosérum supplémenté à l'eau de trempage de maïs (0.1 %). Cependant, Mehaia et Cheryan (1987) ont réussi à obtenir une utilisation complète du lactose pour des concentrations allant de 47 à 134 g/ l lors de la fermentation lactique de perméat de lactosérum (supplémenté à 1% d'extrait de levures) par la même souche de *L. bulgaricus*. Cette différence peut être attribuable à la nature différente du supplément utilisé, soit l'eau de trempage de maïs et l'extrait de levure.

1.3.3.2 Procédé continu et cellules libres

En 1931, Whittier rapporte pour la première fois la bioconversion du lactosérum en lactate par un procédé continu, utilisant un mélange de lactobacilles (*L. bulgaricus*, *L. casei*) et un mycoderme comme biocatalyseurs. Ils ont opéré en continu pendant 20 jours un fermenteur ayant une capacité de 2500 kg, à une température de 43 °C, un pH maintenu entre 5 et 5.8 par addition de lime, et sous faible agitation. Un rendement de 0.9 gramme de lactate par gramme de lactose et une productivité autour de 2.5 g/ L.h ont été obtenus pour un temps de rétention d'un jour.

Keller et Gerhardt (1975) ont obtenu des résultats similaires en utilisant une souche pure de *L. bulgaricus*. Ces auteurs ont observé que l'adaptation préalable des cellules à leur milieu de fermentation augmentait l'efficacité de conversion et la productivité de 3 à 4 fois. Ils ont aussi noté que le déplacement du pH du milieu de 5.0 à 5.8 permettait une amélioration de 50 % des performances.

Les deux travaux précédents n'ont présenté aucune amélioration en terme de temps de résidence (24 h) comparativement au procédé discontinu. L'élimination d'inoculations répétitives, une meilleure disposition pour le contrôle instrumental, une meilleure intégration à des opérations subséquentes et une qualité plus uniforme du produit sont cependant autant d'améliorations inhérentes au procédé continu comparativement au procédé discontinu.

Cox et McBean (1977) ont amélioré la productivité de lactate qui est passée de 3.6 à 10.8 g/l.h lors de la fermentation du perméat de lactosérum par *L. bulgaricus*, en supplémentant le milieu avec 1.5 % d'extrait de levure. La fermentation se faisait en continu à pH 5.6, à la température de 46 °C et un taux de dilution de 0.33 h⁻¹.

L'effet inhibiteur du lactate non dissocié sur le métabolisme et la croissance des cellules, ainsi que celui d'un pH acide ont été identifiés depuis plusieurs décennies (Whittier et Roger, 1931). Ces paramètres ont poussé de nombreux chercheurs à adopter et utiliser des techniques de séparation membranaires pour éliminer le lactate formé d'une part et d'autre part à retenir une densité cellulaire élevée dans le fermenteur.

Parmi ces techniques, les fermenteurs couplés à des unités de dialyse ont été utilisés par de nombreux chercheurs (Freidman et Gaden, 1970 ; Gallup et Gerhardt, 1963 ; Keller et Gerhardt, 1975 ; Stieber et Gerhardt, 1981 ; Couleman et al., 1977)

Stieber et Gerhardt (1979) ont utilisé ce procédé de dialyse en continu pour la fermentation de lactosérum contenant une concentration de lactose de 230 g / l et supplémenté de 0.8 % d'extrait de levure, dont le pH a été maintenu à 5.3 et la température à 44°C. Dans ce système, la souche *L. bulgaricus*, utilisée comme biocatalyseur, a donné une productivité volumétrique de 11 g / l.h , ainsi qu'un rendement de la bioconversion du lactose en lactate de 0.97. Ce système a été en opération pendant 94 jours sans qu'il y ait aucune contamination. Un problème de colmatage de la membrane de dialyse a cependant été rapporté nécessitant un lavage du système toutes les quatre semaines.

Cette technique présente l'avantage d'améliorer la production d'acide lactique en diminuant l'inhibition due au produit, grâce à son retrait du milieu de

fermentation au fur et à mesure de sa formation. La limite de ce procédé se situe au niveau du volume du dialysat qui doit être plus grand que celui du fermenteur pour être efficace (Gerhart et Gallup 1963 ; Abbot et Gerhardt, 1970)

Une technologie plus originale consiste à utiliser un électrodialyseur muni de membranes avec échangeur d'ions (Hongo et al., 1986). Ce procédé permet d'ajuster le pH sans utiliser de neutralisants chimiques. Dans ce système, la quantité de lactate produite (82 g/l) par *L. delbrueckii* était 5 fois plus élevée que celle produite par ce même système sans contrôle de pH.

La combinaison d'un réacteur à mélange parfait avec un module de recyclage de cellules a permis d'utiliser complètement le lactose pour un temps de résidence de 2.9 heures comparativement à 27.5 heures que nécessite le même système sans recyclage de cellules (Stieber et Gerhardt, 1981)

Mehaia et Cheryan (1986) ont augmenté prodigieusement la productivité du lactate en utilisant ce procédé. En maintenant la concentration de *L. bulgaricus* à 60 g/l dans le système, une productivité de 85 g/l.h a été atteinte. Le milieu de fermentation était constitué de perméat de lactosérum contenant 4.6 % de lactose et 1 % d'extrait de levure. Son pH était maintenu à 5.6 par addition d'hydroxyde d'ammonium. La même productivité a été obtenue lorsqu'une concentration de lactose de 15 % a été utilisée (Mehaia et Cheryan, 1987).

La limite de ce procédé se situe aussi au niveau des performances du module membranaire (ultrafiltration) de recyclage (Mehaia et Cheryan, 1986). Lors d'opération en continu à long terme, les problèmes de colmatage inhérents à l'utilisation de membranes d'ultrafiltration, nécessitent l'arrêt de l'opération de ce procédé et la restauration de la membrane. La viscosité du milieu augmente avec la densité des cellules ce qui augmente les coûts d'opération dûs à la consommation accrue d'énergie de pompage.

1.3.3.3 Système à cellules immobilisées

Le premier exemple de l'utilisation de cellules vivantes immobilisées remonte à 1823 dans l'industrie du vinaigre. Le procédé inventé par Scheutzenbach comprenait un réservoir en bois ayant un fond perforé, et rempli de copeaux de bois sur lesquels des biofilms (*Acetobacter* probablement) étaient développés. Des solutions d'alcool percolant à travers le lit de copeaux, étaient oxydées en acide acétique par les cellules. Le procédé était associé à une conversion chimique plutôt que biologique, et il faudra attendre 1864 pour que Pasteur démontre le contraire. Le premier système de cellules immobilisées conçu rationnellement et reconnu comme tel fut aussi développé par Pasteur en 1868 (Kennedy et Cabral, 1983).

La définition des cellules immobilisées découle directement de celle des enzymes immobilisés qui fut établie à la première conférence mondiale du génie des enzymes. Ainsi, les cellules immobilisées sont définies comme des cellules entières confinées ou localisées dans une certaine région de l'espace avec conservation de leurs activités catalytiques et qui peuvent être utilisées de façon continue et répétée (Wiseman, 1985).

Il existe différentes façons de classer les systèmes à cellules immobilisées. La classification basée sur la nature de l'interaction responsable de l'immobilisation (Birnbaum *et al.*, 1986) est parmi celles qui sont les plus utilisées. L'interaction peut être de nature chimique impliquant des liens chimiques, covalents ou autres, entre un groupement réactif de la surface cellulaire et le support, ou entre deux ou plusieurs cellules. Elle peut être aussi de nature physique, ce qui englobe toutes les autres méthodes n'impliquant pas de liens chimiques. Ces différentes méthodes sont présentées dans la figure # 1.

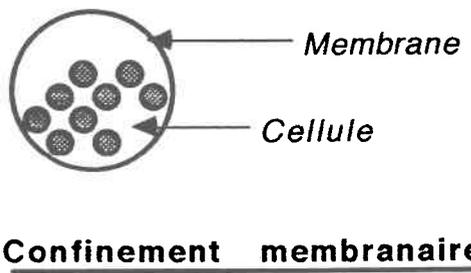
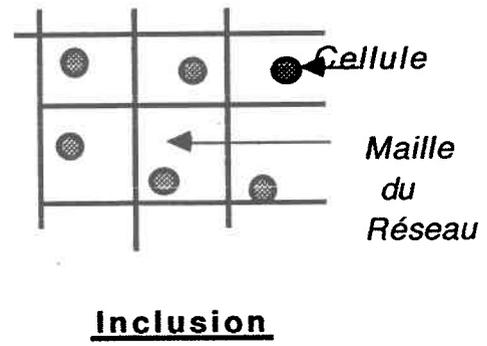
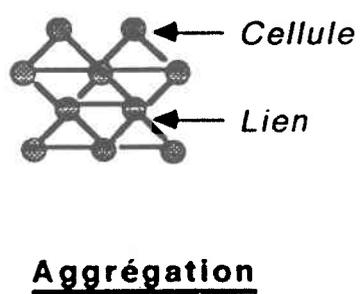
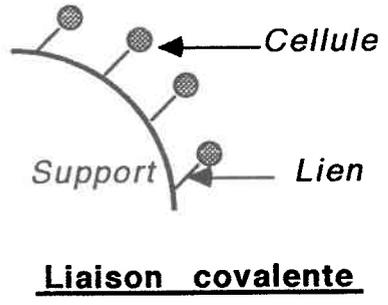
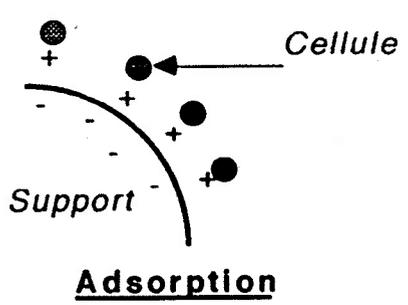


Figure 1 Principales méthodes d'immobilisation des cellules.

Dans ce paragraphe on se limitera à décrire succinctement les méthodes d'immobilisation des cellules les plus fréquentes en y adjoignant quelques exemples concernant la fermentation lactique quand cela est possible. Les méthodes concernant les cellules "libres" confinées ont été en partie décrites dans la section de la fermentation continue, et ne seront plus abordées dans cette section.

L'immobilisation des cellules entières par inclusion dans un support solide est la méthode la plus utilisée (Kennedy et Cabral, 1983 ; Durand et al., 1978 ; Champagne et Côté, 1987), en particulier pour ce qui concerne les bactéries lactiques (Linko et al., 1980, 1982 ; Stenros et al., 1982 ; Champagne et Boyaval, 1985 ; Tuli, 1985 ; Roy et al., 1985 ; Audet, et al., 1988, 1989)

Cette méthode d'immobilisation par inclusion est considérée comme la première méthode d'immobilisation moderne, et elle est attribuée à Mosbach (1966). Divies (1977), inspiré des travaux de Mosbach a utilisé un polymère synthétique (gel de polyacrylamide) pour immobiliser des cellules de *L. delbruekii*. Une quantité de 8.2 g de monomère acrylamide et N-N méthylène bis-acrylamide (81 % d'acrylamide) ainsi que 200 mg de sulfate d'ammonium, ont été ajoutés à une suspension de cellules dans 100 ml de tampon phosphate (0.05 M, pH = 7) et à une température de 15 °C. La polymérisation a été complétée en une à deux minutes. Une productivité de 14 g/l.h (basée sur le volume du catalyseur) a été obtenue lors de la fermentation d'un milieu contenant 10 % de glucose. La toxicité chimique du gel polyacrylamide et l'hypertonie induite par le monomère a limité très fortement l'utilisation de ce support dans la fermentation lactique.

Pour palier à ce problème d'hypertonie, l'utilisation de gels organiques d'origine naturelle représente une bonne alternative (Brodelius et al., 1987). Ce fait a poussé les chercheurs à les utiliser de façon plus extensive.

Tuli (1985) a comparé la capacité de deux matrices, un gel d'agar (2 %) et de polyacrylamide, à immobiliser des cellules *L. casei* pour la fermentation lactique de perméat de lactosérum. Le gel d'agar a montré la meilleure efficacité

pour l'inclusion et la rétention des cellules. Cependant, la fragilité de ce gel étant notoire, l'intérêt de cette matrice n'est que marginal. Linko (1980) a utilisé un gel d'alginate de calcium pour immobiliser *L.lactis*. Des billes de 2 millimètres de diamètre furent obtenues après qu'une suspension de cellules dans une solution de 6-8 % d'alginate de sodium, soit extrudée dans une autre solution de chlorure de calcium (0.5 M). Ce système immobilisé a pu être utilisé un minimum de 5 cycles en mode discontinu, sans perte d'activité métabolique, pour la bioconversion d'une solution à 2 % de glucose en lactate. Roy *et al.*, (1987); Boyaval *et al.*,(1985); Linko et Linko (1984), ont aussi utilisé cette matrice pour immobiliser *L.helveticus*.

Récemment, Roukas (1991) a comparé quatre matrices, Agar, K - carragénane, polyacrylamide et alginate de calcium, pour leur capacité à immobiliser *L. lactis*, *L. casei* et un mélange des deux. C'est la matrice d'alginate de calcium qui a donné les meilleurs résultats avec une concentration en lactate de 40 g/ L et une productivité en lactate de 0.86 g/ L.h. Les performances des matrices de gel de K-carragénane et d'agar étaient très proches avec une concentration de lactate produit de 38 g/ l et une productivité de 0.79 g/l.h . Le gel de polyacrylamide a présenté les plus faibles performances comparativement aux autres matrices.

La méthode d'immobilisation par inclusion semble être simple et douce, mais elle a l'inconvénient de présenter une barrière à la diffusion de substrat (transfert de masse) ce qui se traduit généralement par une faible productivité (Salmon , 1981; Chang et Park, 1985).

L'immobilisation par adsorption de cellules à des supports solides est un processus impliquant des interactions de surface entre les cellules et le matériel du support (Webb, 1986). Ces interactions sont non spécifiques et de nature électrostatiques (Krekeler *et al.*,1990) représentées essentiellement par des liens chimiques faibles de type Van der Waals, ioniques et hydrogène (Marshall, 1988 ; Bitton et Marshall, 1980).

Dans les premières étapes de l'adsorption, le rôle des forces électrostatiques est primordial, car toute répulsion électrostatique doit être surmontée pour qu'il y ait immobilisation. La charge électrostatique est quantifiée par le potentiel Zéta (Ho, 1986). Dans le cas où le support et les cellules ont des potentiels Zéta opposés une force électromotrice est induite, conduisant à une

immobilisation à l'interface support-cellules (Gerson et Zajic, 1979). Cette interface représente aussi une zone préférentielle d'accumulation des nutriments.

Des solutions diluées de sels divalents tels le CaCl_2 ou le AlSO_4 annihilent l'effet du potentiel Zéta sur les surfaces du support et des cellules et peuvent ainsi jouer le rôle de ponts entre deux surfaces négativement chargées. Des polymères organiques solubles peuvent aussi modifier le potentiel Zéta de surfaces cellulaires et celles de support (Michaux *et.al.*, 1982)

L'adsorption est un processus qui peut être réversible et amener à l'état libre, des cellules immobilisées. Cette désorption peut être largement provoquée par la variation de la force ionique et/ou par le pH du milieu. La croissance continue des cellules peut aussi excéder la capacité de rétention du support et conduire au relargage des cellules. Les forces de cisaillements élevées accompagnant les taux de dilution élevés, les échanges gazeux ou l'effet abrasif de composantes particulaires du liquide d'alimentation peuvent contribuer de façon significative à la désorption des cellules immobilisées (Atkinson *et.al.*, 1980). La stabilité des biofilms adsorbés peut être drastiquement améliorée par la mise en jeu de substances polymériques sécrétées par les cellules elles même. L'attachement des cellules aux surfaces du support est alors plus permanent en présence des exsudats polymériques comparativement à la présence exclusive des forces électrostatiques (Fletcher, 1990)

L'état physiologique des cellules peut, dans certains cas, influencer grandement leur adsorption sur des supports solides (Hammer, 1990). Ainsi, des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, à jeûn de nutriments, augmentent grandement leur autoadsorption sur des supports de fibres de verre (Bringi et Dale, 1985). Les systèmes de culture en milieu liquide avec agitation conduisent au remplacement de souches cellulaires produisant les exsudats polymériques par celles qui n'en produisent pas (Tampion, 1987).

Dans le cas de procédés d'immobilisation passifs (adsorption..), la rétention de grandes densités cellulaires ne peut être réalisée que lorsque des surfaces adéquates du support sont disponibles. De nombreux paramètres concernant la nature et la structure de la surface du support gouvernent la réussite ou l'échec de l'adsorption des cellules. Pour des supports poreux, principalement inorganiques, la dimension des pores représente une caractéristique majeure de la structure de la surface des supports. Messing (1979) a proposé une théorie concernant la dimension optimale des pores pour l'immobilisation de cellules; elle devrait être 5

fois plus élevée que la dimension moyenne des cellules se multipliant par fission, et 16 fois plus élevée pour celles qui se multiplient par bourgeonnement. L'origine du support peut aussi avoir un effet sur l'adsorption. Il a été rapporté par Messing (1982) que la céramique Zirconia accumule une plus grande quantité de cellules, comparativement au verre et à la cordélite. Ces supports sont tous de nature inorganique possédant des pores de même dimension et à la même densité.

L'immobilisation de cellules par la méthode d'adsorption est basée, en résumé, essentiellement sur les interactions électrostatiques du type van der Waals, liens ioniques et hydrogènes, entre la surface des cellules et celle de la matrice du support solide (Gerson et Zajic, 1979 ; Kennedy et Cabral, 1983). Le potentiel zéta réel de la surface cellulaire et celle du support solide jouent aussi un rôle important dans l'interaction entre les cellules et le support. (Daniel, 1971). La composition de l'enveloppe cellulaire et du support influencent également cette interaction ainsi que la morphologie du support et plus particulièrement celle de ses pores.

Les exemples d'utilisation de cette méthode d'immobilisation rapportés dans la littérature concernent très fréquemment l'immobilisation de levures pour la production d'éthanol en mode continu. Cheung (1986) a immobilisé des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* sur des copeaux de bagasse. La conversion complète du glucose en éthanol a été obtenue à un taux de dilution de 0.19 h^{-1} . La production en continu d'éthanol a été maintenue pour plus de 57 jours. Tyagi et Ghose (1982) ont obtenu une conversion complète de la mélasse en éthanol, à un taux de dilution deux fois plus élevé (0.4 h^{-1}), en utilisant des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* immobilisées par le procédé décrit dans le brevet indien # 35/Del/80. Une productivité maximale élevée, de 28.6 g/l.h , a été obtenue en opérant le bioréacteur à une température de 30°C et un pH de 5.0. Moo Young (1980) a utilisé des copeaux de bois comme support solide. Aucun effet évident n'a été observé sur la quantité de cellules adsorbées lorsque le pH est passé de 4 à 5 et la température de 22°C et 37°C . Par contre, lors de la réduction de la longueur des copeaux de bois de 2.12 à 1.2 cm, la quantité de cellules adsorbées a triplé, passant de 70 à 190 mg de cellules (poids sec) par gramme de support. Ce système de levures immobilisées a présenté une productivité typique d'éthanol de 21.8 g/l.h , qui se compare bien à une productivité de 18 à 32 g/l.h obtenue par des cellules libres cultivées dans des fermenteurs parfaitement agités avec recyclage cellulaire. Ruy (1982) a utilisé le même support pour immobiliser des cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Le système a présenté une rétention cellulaire de 40 g de cellules par litre de réacteur que les auteurs ont jugé très bonne. Deux

configurations de réacteurs ont été utilisées : tubulaire et à étapes multiples. Cette dernière a présenté les meilleures performances avec une concentration d'alcool produit de 16.5 % (V/V) au lieu de 13.5 % (V/V) pour le réacteur tubulaire et une productivité de 4.8 g/l.h au lieu de 2.2 g/l.h. Cette supériorité serait attribuable à une meilleure distribution de la biomasse active, et un gradient de concentration d'alcool plus bas

Cette méthode d'immobilisation par adsorption est douce et non spécifique. Elle présente l'avantage majeur de conserver la viabilité des cellules immobilisées ainsi que leur activité métabolique (Kolot, 1980 ; Ho, 1986 ; Fletcher, 1990). Cette méthode est reconnue comme étant la plus simple pour immobiliser de grandes quantités de cellules (Ruy et al., 1982).

Par le renouvellement continu du milieu de fermentation, les procédés continus présentent l'avantage de maintenir une concentration contrôlée du substrat dans le réacteur, alors que pour les procédés discontinus, la concentration du substrat est épuisée en fonction de la durée de la fermentation. Pour les procédés continus, il est donc possible de maintenir les cellules en phase exponentielle de croissance, impliquant une conversion plus rapide du substrat et une productivité plus élevée. Les avantages les plus notables liés aux procédés continus, sont la réduction drastique du volume des installations et du matériel employés (Brodelius et Vandamme, 1987), ainsi que celui des coûts générés par l'arrêt, le drainage, le remplissage et le redémarrage de la fermentation inhérents aux procédés discontinus.

L'utilisation des cellules immobilisées au lieu des cellules libres dans les procédés de fermentation présente de nombreux avantages (Kennedy et Cabral, 1987; Fukui et Tanaka, 1982 ; Buchholz, 1982). Elle permet d'obtenir un contrôle plus important sur le déroulement de la réaction (Durand et Moissan, 1978). En effet , elle rend l'automatisation du procédé plus accessible ce qui permet de mieux rationaliser le fonctionnement du réacteur. Les cellules immobilisées sont plus stables que les cellules libres (Atkinson, 1986), moins susceptibles à la contamination et peuvent être facilement séparées du produit (Engasser, 1988) Les cellules immobilisées sont plus faciles à manipuler et permettent d'exploiter les avantages des différentes configurations de réacteurs (Buchholz, 1982 ; Atkinson 1986). De plus grandes concentrations de cellules peuvent être atteintes et conservées dans le bioréacteur grâce au procédé d'immobilisation des cellules

(Brodélius et Vandamme, 1987). Les procédés de cellules immobilisées génèrent une viscosité plus faible que les procédés de cellules libres pour une même quantité de biomasse, ce qui se traduit par de meilleures propriétés de transfert de masse (Chibata et.al., 1983). Les bioréacteurs à cellules immobilisées génèrent des productivités beaucoup plus élevées que celles des cellules libres grâce à la possibilité de les opérer à des taux de dilution qui dépassent largement le taux spécifique maximal de croissance cellulaire, ce qui conduirait au lessivage cellulaire et l'arrêt de la fermentation dans le cas des cellules libres.

La comparaison des procédés discontinus, continus, avec cellules libres et cellules immobilisées tendent à démontrer la supériorité des procédés continus à cellules immobilisées sur tous les autres procédés.

L'immobilisation des lactobacilles par adsorption sur des copeaux de bagasse est une méthode douce qui permet de conserver la viabilité des cellules et par conséquent leur activité métabolique, et sa mise en oeuvre en procédé continu pour la conversion du perméat de lactosérum, lui assure les avantages liés aux procédés continus des cellules immobilisées.

1.3.4 Les supports

Une infinité de structures solides peuvent remplir le rôle de support pour l'immobilisation de cellules. Selon leur nature chimique, ils se distribuent entre deux grandes classes : organique et inorganique. Les supports inorganiques se caractérisent par une très haute stabilité thermique et de bonnes propriétés rhéologiques, d'où leur utilisation plus fréquente dans le passé comparativement aux supports organiques. Les supports inorganiques les plus utilisés sont les silicates, l'aluminium, le verre, les céramiques, le zirconium, le magnésium et les oxydes de fer (Ellwood et.al., 1982)).

Aujourd'hui, les supports organiques sont considérés supérieurs aux supports inorganiques (Kollot, 1981; Hollo et al., 1979), dans une large mesure grâce à la très grande variété des groupements réactifs (carboxyl, amino, hydroxyl) qui peuvent être disponibles à leur surface.

Les supports organiques peuvent être classés en trois groupes en fonction de leur composition chimique. Le premier groupe concerne les polymères synthétiques qui sont les plus nombreux et qui englobent les acrylamides, les résines phénoliques et les polymères polystyrènes (Brodelius et Vadamme, 1987). Le deuxième groupe est celui des protéines. C'est le groupe qui comprend le moins d'éléments et dont le principal représentant est le collagène. Le dernier groupe est celui des polysaccharides comprenant la cellulose, l'agar, le carragenane, la pectine, l'agarose et le séphadex. Les éléments de ce groupe sont essentiellement des supports organiques naturels.

Un autre critère important de classification des supports solides concerne leur porosité. Les supports solides poreux sont beaucoup plus avantageux à utiliser que les supports non poreux, et cela autant pour l'immobilisation des enzymes que des cellules (Messing, 1979 ; Kolot, 1981). Ils sont particulièrement bien désignés lorsque des procédures passives d'immobilisation cellulaire (Adsorption) sont utilisées. Leur surface spécifique élevée, ainsi que leur structure poreuse favorisent considérablement l'immobilisation des cellules aussi bien à l'intérieur des pores qu'à la surface du support.

Le support organique poreux choisit dans notre expérience pour immobiliser les lactobacilles est la bagasse. C'est le résidu fibreux de la canne à sucre obtenu après l'extraction du jus sucré.

La structure physique de la bagasse présente deux composantes majeures : les fibres dures, qui constituent la partie externe de la tige de la canne à sucre, et la moelle parenchymateuse, qui constitue la partie interne de la tige (Lacey, 1980). Ces constituants ont une composition chimique semblable. Sur une base sèche (50% d'humidité), la bagasse est constituée essentiellement de fibres (93%), le restant (7%) étant constitué de solides solubles, qui sont principalement des sucres. Les fibres sont insolubles dans l'eau, et possèdent un rapport élevé de longueur / diamètre (70), ainsi qu'un haut coefficient de contraction et d'expansion pour le mouillage et le séchage. Chimiquement, elles sont composées de cellulose vraie, de pentosanes et de lignine dont les proportions sur une base sèche sont respectivement de 50%, 30% et 20% (Patureau, 1969). Une des meilleures techniques de conservation de la bagasse, appelée procédé Ritter, consiste à immerger la bagasse dans une suspension de bactéries lactiques où le milieu est acidifié par fermentation des sucres réfractaires au procédé d'extraction (Mobius, 1975).

Parmi les supports organiques et poreux naturels, la bagasse représente un choix très intéressant de part sa grande disponibilité, son coût très faible et sa capacité à retenir de grandes quantités de cellules (Cheung *et al.*, 1986)

II) MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 PRÉPARATION DU PÉRMEAT DE LACTOSÉRUM

Le lactosérum est reconstitué en réhydratant de la poudre de lactosérum provenant de la fabrication de fromage cheddar doux (Kraffen, kraft [low heat]) dans de l'eau déionisée (Résine échangeuse d'ions). La concentration de solides réhydratés est de 6.5% (masse/volume). Le mélange est ensuite agité jusqu'à dissolution complète de la poudre. De l'extrait de levures (Difco) est additionné pour compléter le lactosérum dissout dans une proportion de 1.5% (masse/volume). Le perméat est obtenu par ultrafiltration du lactosérum complété, en utilisant un appareil Amicon D.C 30A muni d'une cartouche H10P10 ayant un seuil de rétention de 10000 daltons et opéré sous une pression de 15 psi.

Le perméat obtenu est alors acidifié à pH 3.6 avec de l'acide chlorhydrique concentré (ACS) et immédiatement congelé à une température de -20°C jusqu'à son utilisation ultérieure. Le perméat est décongelé à la température de la pièce au moment de son utilisation. Il est stérilisé à 121 °C pendant 30 minutes à une pression de 15 psi, et ensuite refroidi à la température pièce avant son utilisation. La dernière étape de préparation du perméat consiste à élever son pH à 5.8 avec de l'hydroxyl d'ammonium concentré (ACS).

2.2 MICROORGANISMES UTILISÉS DANS CE PROJET

Dans ce projet, les différentes espèces et souches bactériennes utilisées sont :

Lactobacillus helveticus ATCC 10797

Lactobacillus helveticus Milano (Institut Rosell, Montréal)

Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus ATCC 11849

Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus Hansen, 2217

Lactobacillus casei casei Université Laval, département STA.

Les différentes souches sont conservées dans le lait écrémé stérilisé, inoculé à 2% et stockées à -45 °C dans des tubes eppendorf. Elles sont repiquées périodiquement toutes les trois semaines.

Parmi ces différentes espèces de lactobacilles testées, trois ont été retenues pour leur capacité acidifiante plus élevée, et leur taux de croissance spécifique plus bas, soit :

Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus Hansen 2217

Lactobacillus delbruekii subsp bulgaricus ATCC 11849

Lactobacillus helveticus ATCC 10797

2.3 LES MILIEUX DE CULTURES UTILISÉS DANS CE PROJET

2.3.1 Composition du milieu MRS :

Tableau 2: Ingrédients dans un litre de milieu MRS , pH final à 6.5.

Ingrédients	Masse (g)	Ingrédients	Masse (g)
Bacto Protéose Peptone	10	Citrate Ammonium	2
Bacto Extrait Levure	5	Acétate Sodium	5
Dextrose	20	Sulfate Magnesium	0.1
Sorbitan Monooléate	1	Sulfate Manganese	0.05
Bacto Extrait Boeuf	10	Phosphate Disodique	2

2.3.2 Composition du milieu Elliker :

Tableau 3 : Ingrédients dans un litre de milieu Elliker, pH final à 6.8

Ingrédients	Masse (g)	Ingrédients	Masse (g)
Bacto Tryptone	20	Bacto Saccharose	5
Bacto Extrait Levure	5	Acétate Sodium	1.5
Bacto Gélatine	2.5	Chlorure Sodium	4
Bacto Dextrose	5	Acide Ascorbique	0.5
Bacto Lactose	5		

2.3.3 Lait écrémé :

Le lait écrémé est reconstitué en réhydratant de la poudre (Difco) à une concentration de 12% (P/V). La stérilisation se fait à une température de 121°C pendant 10 minutes à une pression de 15 psi. Le lait écrémé sert de milieu de conservation des différentes souches utilisées pour ce projet. Il sert aussi pour la première propagation des cellules, destinées ultérieurement à la fermentation continue ou discontinue.

2.4 IMMOBILISATION DES CELLULES

2.4.1 Préparation du support :

Les roseaux de bagasse secs sont découpés en copeaux de 1.5 cm de long , 1 cm de large et 0.5 cm de haut. Les copeaux sont ensuite criblés sur un tamis pour éliminer les poussières et les fines particules. Une quantité déterminée de bagasse est ensuite transférée dans deux erlenmeyers de 500 ml où elle est submergée d'eau déionisée. Le support est stérilisé à une température de 121°C, une pression de 15 psi pendant une heure. L'eau est ensuite aseptiquement et complètement drainée. Cette opération est répétée deux fois.

2.4.2 Préparation des cellules :

Dans une première étape, les cellules sont propagées en inoculant dans un erlenmeyer stérile (50 ml) , un volume de 10 ml de lait écrémé stérile (10 min , à 121°C et 15 psi) avec 2 ml d'inoculum. Le milieu est incubé à 45 °C (37 °C pour *L. casei casei*) pendant 8 heures. La qualité du ferment obtenu est vérifiée en routine en observant la morphologie des cellules au microscope (Coloration Gram et Bleu de méthylène) et en dosant l'acidité du milieu (pH doit être \approx 4.5 unité de pH).

Dans la deuxième étape , un fermenteur (New Brunswick, Bio Flo 30) contenant du milieu MRS (\approx 900 ml) stérile (121 °C , 15 psi et 20 min) est inoculé à une concentration de 2% avec le ferment obtenu à la première étape. Cette deuxième propagation cellulaire est réalisée à une température de 45 °C avec une agitation à une vitesse de 200 rpm et sans contrôle de pH. Après 16 heures de fermentation , les cellules sont récoltées en centrifugant à une vitesse de 8000 x g pendant 15 min (Sorval). L'amas cellulaire obtenu est rincé deux fois avec 5 volumes de milieu MRS stérile, et resuspendu dans 20 ml de milieu MRS frais.

2.4.3 Immobilisation des cellules :

La suspension cellulaire très dense obtenue à l'étape de la préparation des cellules, est transférée aseptiquement dans deux erlenmeyers stériles (500 ml)

contenant une masse identique de support. Les erlenmeyers contenant le système support-cellules sont ensuite placés dans un agitateur (New Brunswick Shaker) à une température de 5 °C et agités à 200 rpm pendant une heure. Le liquide est ensuite drainé aseptiquement système support-cellules immobilisées est finalement transféré aseptiquement dans une colonne stérile en verre. Une couche de fibres de verre tapisse le fond de la colonne pour assurer la rétention du support avec les cellules immobilisées.

2.5 DESCRIPTION DU MONTAGE EXPÉRIMENTAL

2.5.1 Description du schéma expérimental:

Une pompe péristaltique (masterflex) alimente à différents débits la base du bioréacteur en perméat. Le perméat (3 l) est contenu dans une bouteille de pyrex de 4 l. Un tube masterflex 7013 (food grade) d'une longueur de 20 cm relie la bouteille d'alimentation au bioréacteur. Un autre tube relie la sortie latérale la plus haute du bioréacteur à la bouteille de stockage du produit (capacité de 25 l). Sur ce tube, une pompe identique à la précédente est installée à une distance de 15 cm de la sortie latérale. Deux systèmes en verre dilaté permettant de prévenir la contamination du bioréacteur (voir Figure 4) sont placés avant chaque point d'échantillonnage. Ces deux points d'échantillonnage sont situés en amont et en aval du bioréacteur. Ceux-ci sont des dérivations faites sur chaque tube, constituées d'un T en verre dont l'extrémité extérieure est prolongée par un segment de propylène. Ce dernier est tenu hermétiquement fermé par deux vissees situées à deux niveaux différents. Cet ensemble est ensuite complètement submergé d'éthanol 90 % contenu dans un erlenmeyer scellé avec de la parafine.

L'ensemble du matériel du montage expérimental est préalablement stérilisé à 121 °C et une pression de 15 psi pendant 2 heures.

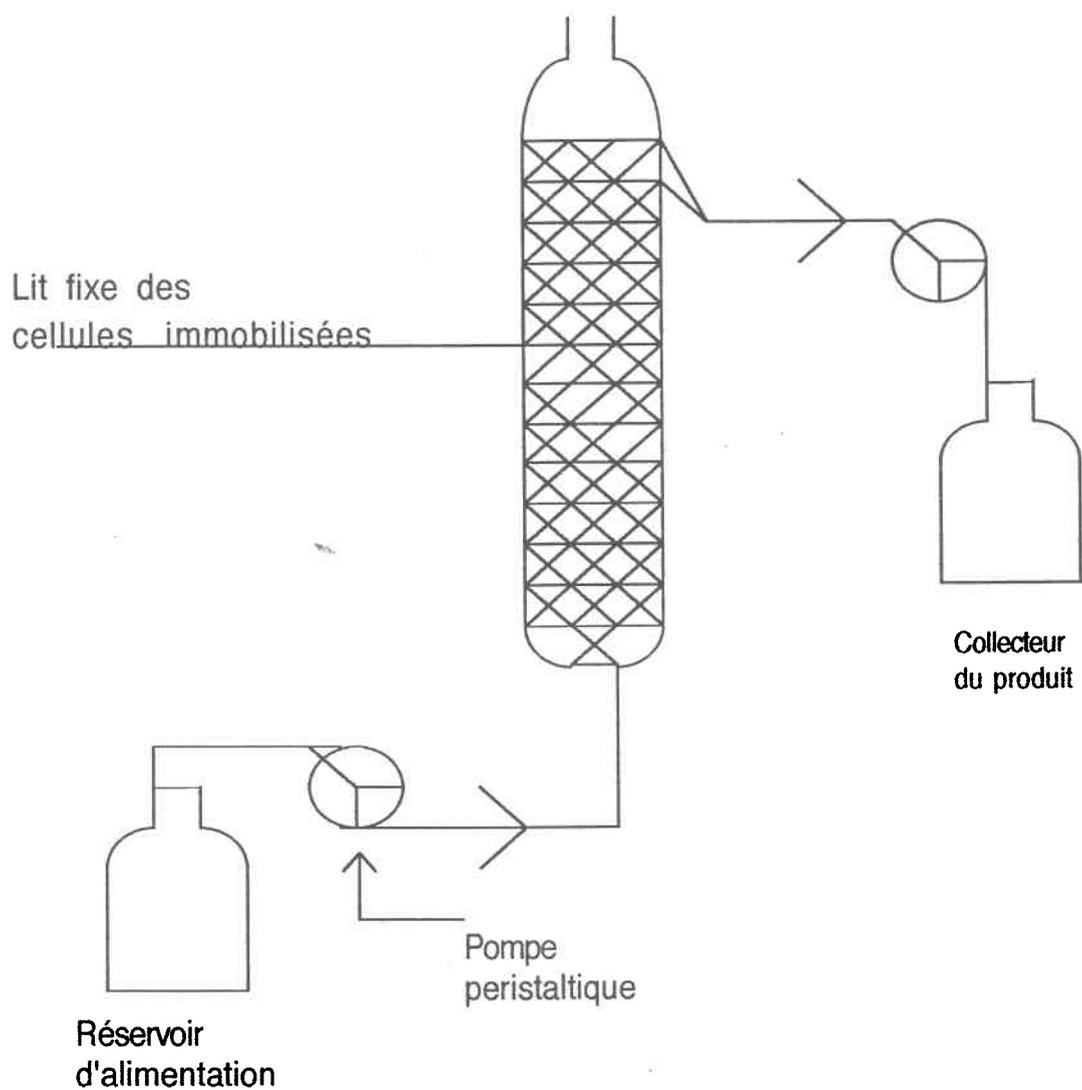


Fig. 2: Représentation schématique simple du montage expérimental réalisé du système de lactobacillus immobilisés sur le support de bagasse et opéré en continu dans une configuration lit fixe .

2.5.2 Description de la colonne:

2.5.2.1 Description de la colonne vide:

La colonne de verre utilisée (voir Figure 3) a une hauteur totale de 30 cm et un diamètre interne de 4.5 cm. Elle est munie de quatre sorties latérales à 4, 10, 16 et 22 cm de la base de la colonne, ainsi que d'une sortie à sa base. Toutes les sorties latérales sont étanchement bouchées avec des septums. Ces derniers permettent de réaliser des échantillonnages en y introduisant des seringues munies d'aiguille. Un bouchon de verre ferme étanchement (joint rodé) la colonne. Son sommet est muni d'une sortie sur laquelle est adapté un filtre de 0.45 μm pour prévenir toute contamination tout en assurant une prise d'air.

2.5.2.2 Description de la colonne garnie:

Deux types de bioréacteurs ont été réalisés: avec et sans contrôle de pH.

Dans les deux colonnes le fond conique est tapissé de laine de fibre de verre (stérilisées au préalable à 121°C et 15 psi) Le système support-cellules est transféré aseptiquement dans la colonne, celle-ci est remplie jusqu'au niveau de la dernière sortie latérale.

Le bioréacteur avec contrôle du pH se différencie du bioréacteur sans contrôle de pH par la mise en place de couches de granules de carbonates de calcium (Fisher). Ces dernières sont insérées à différents niveaux (voir Figure 3) du lit fixe du système support cellules. La quantité totale de carbonate utilisée est de 100 g. Elle est stérilisée à 121°C, 15 psi pendant 2 heures.

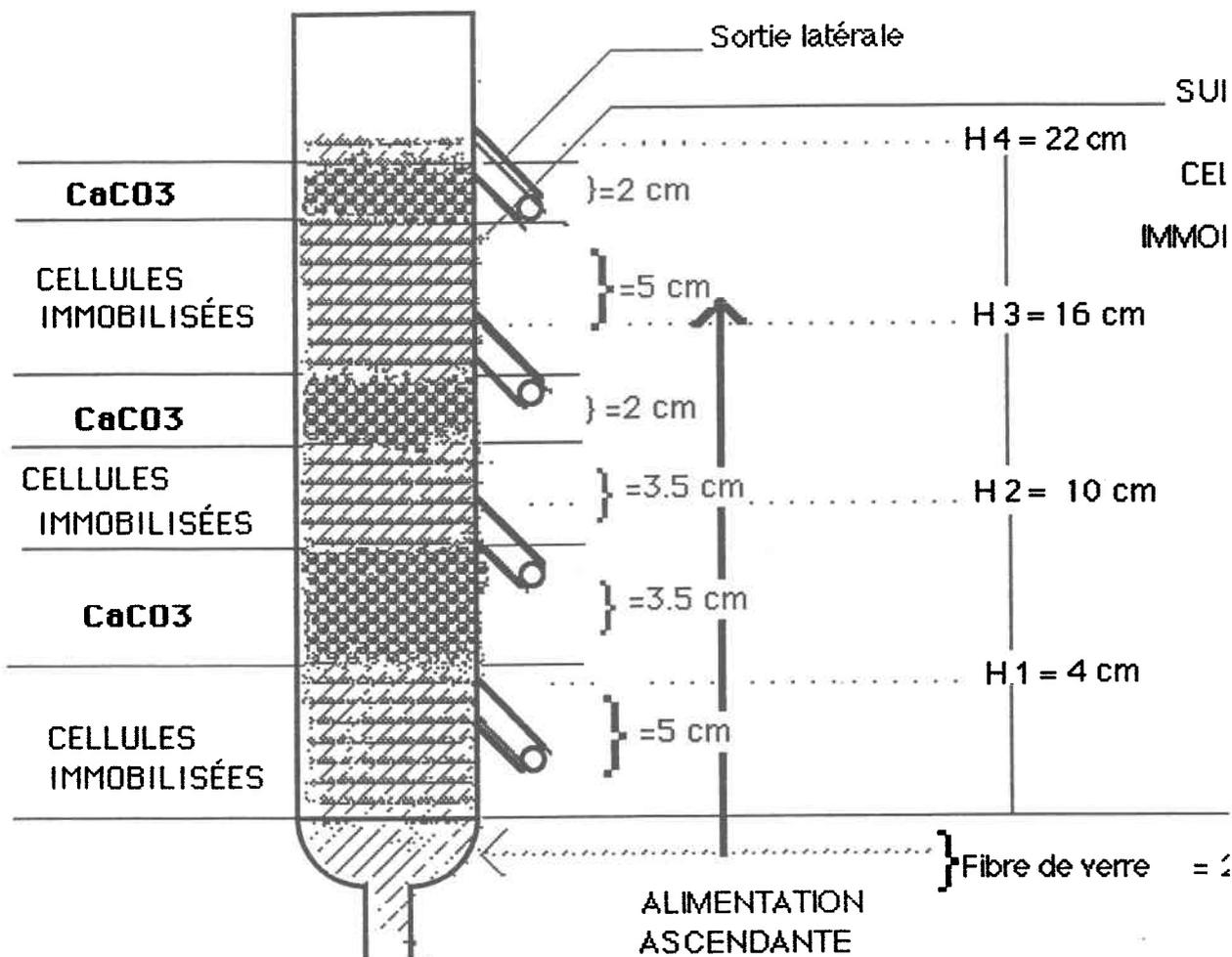


Figure 3 Schéma de la colonne garnie de support et de granules de carbonates de calcium.

2.5.3 Description de la procédure d'optimisation de l'immobilisation :

Quatre longueurs de copeaux de bagasse ont été utilisées : 1.0, 1.5, 2.0 et 3.0 cm. Chaque série a été faite en 18 réplicats.

Pour chaque combinaison de température et de pH , trois replicats ont été réalisés et cela pour chacune des quatre séries , ce qui représente un total de 72 échantillons auxquels s'ajoutent 24 témoins , pour chacune des conditions expérimentales.

Les blancs utilisés, correspondent à du milieu de culture dépourvu de cellule.

Dans la procédure expérimentale, une culture de *L.bulgaricus* Hansen 2217 est préparée dans un milieu de perméat de lactosérum à 4.5% de lactose et supplémenté à 1.5% d'extrait de levures et incubée à 45°C , pour 16 heures. Une concentration finale de 2.7×10^9 cellules/ml est obtenue. Deux grammes de supports sont pesés (Sinon, on tient compte du poids mesuré pour les calculs). Le support est alors mis dans un erlenmeyer (100 ml). Un volume de 50 ml du milieu de culture au pH déterminé (3, 5 et 7) y est alors ajouté dans une chambre froide (5°C). Les différents erlenmeyers sont alors incubés aux températures définies, et maintenues sous agitation à 200 rpm. Les échantillons ont été prélevés à zéro, une, deux et quarante-huit heures. Le volume prélevé du milieu est de 1 ml. Des précautions sont prises pour que le milieu prélevé soit aussi homogène que possible et par conséquent , que l'échantillon soit réellement représentatif. Après avoir pesé l'échantillon , ce dernier est minéralisé à une température de 105 °C pendant 24 heures. Les échantillons sont ensuite refroidis dans une cloche de dissécaton, et transférés pour mesurer leur poids sec.

2.6 ÉCHANTILLONNAGE

Après le passage d'un volume de perméat équivalent au volume réactionnel du bioréacteur, un échantillon de 5 ml est prélevé après l'élimination du volume mort (2 ml) à chaque sortie latérale du bioréacteur. L'échantillonnage se fait par ponction avec une seringue et une aiguille stérile. Un échantillon est simultanément prélevé sur la ligne en aval du bioréacteur. Après chaque changement du débit d'alimentation du bioréacteur ainsi que celui de la bouteille d'alimentation, un échantillon est systématiquement prélevé en amont du bioréacteur.

Tous les échantillons sont immédiatement passés sur des filtres de 0.45 μm et recueillis dans des flacons stériles. Ils sont rapidement entreposés dans un congélateur à une température de -45 °C jusqu'au moment du dosage.

2.7 ANALYSES

Tous les échantillons sont dégelés immédiatement avant les analyses.

2.7.1 Les cellules :

Trois méthodes de dosage de la biomasse ont été utilisées et corrélées : soit le dénombrement des colonies vivantes, la densité optique (D.O) à la longueur d'onde de 620 nm et finalement, le poids sec de la biomasse.

Le dénombrement des colonies vivantes s'est réalisé en inoculant un volume de 1 ml du milieu à différentes dilutions (10^0 à 10^9) sur de la gélose Elliker (Difco) solidifiée avec 1% de Bacto agar (Difco). L'incubation se fait à une température de 43°C pendant 24 heures. Les colonies sont alors directement dénombrées sur les pétris.

2.7.2 Le pH

Le pH des échantillons est mesuré avec un pH-mètre de marque 26 Radiometer Copenhagen

2.7.3 Le dosage des sucres :

Le lactose est dosé par la méthode de Dubois (1956) telle que modifiée par Montgomery (1961) utilisant le phénol et l'acide sulfurique comme réactifs. Ces derniers en présence d'hydrates de carbone, forment des complexes chromophores qui absorbent à une longueur d'onde de 490 nm. Une courbe standard est préparée pour chaque série d'analyses. Des concentrations de 0.1 à 0.01 g/l de lactose standard (Aldrich) sont préparés pour établir la courbe standard. La précision est de l'ordre de 0.5%.

2.7.4 Le dosage de l'acide lactique :

L'acide lactique est dosé par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) , par la méthode de Marsili et.al. (1981) qui est une technique isocratique simple.

L'appareil utilisé est un HPLC de marque Waters 600 équipé d'une précolonne [Microguard Ion Exclusion Cartridge] et d'une colonne de marque BioRad, de modèle Aminex HPX-87H. Un spectrophotomètre à multiples longueurs d'ondes programmables (Waters 490), une interface (Nelson Analytical 900) ainsi qu'un microordinateur complètent l'appareillage. Les échantillons à analyser sont d'abord passés sur filtre Millipore 0.45 μm Millex-GS pour éliminer les cellules et autres particules, ensuite un volume de 20 μl du filtrat est injecté. La colonne est opérée à la température de la pièce, et la pression à la tête de la colonne est maintenue entre 650 et 750 psi. La phase mobile utilisée est de l'acide sulfurique 0.009 N (ACS) alimenté à un débit de 0.25 ml/min. Trois longueurs d'ondes ont été utilisées simultanément soit : 190, 220 et 275 nm, et la sensibilité utilisée était de 0.2 AUFS. L'analyse est réalisée selon le mode isocratique à un débit de 0.25 ml/min , à la température de la pièce et une durée d'élution de 30 min. Les acides acétique, formique, lactique, pyruvique, citrique et propionique ont été utilisés à différentes concentrations pour établir les standards externes de la méthode. Chaque échantillon est repassé sur un filtre 0.22 μm , et dilué avec de l'eau ultrapure avant d'être injecté dans l'appareil. La précision de cette méthode est supérieure à 0.1 ppm.

III) RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 SUPPORT ET CELLULES IMMOBILISÉES

3.1.1 Analyse descriptive du système Support/Cellules immobilisées

Cette analyse repose sur la description de l'ultrastructure du système support-cellules immobilisées, obtenue par microscopie électronique à balayage à différents grossissements. Le système analysé correspond à des segments de roseaux de bagasse de 1.5 cm de longueur, 1 cm de largeur et d'épaisseur. Sur ce support une souche pure de *L. bulgaricus* Hansen 2217 a été immobilisée dans un rapport de 1 gramme de cellules (base humide) par gramme de support (base sèche) (Voir Matériel et méthodes).

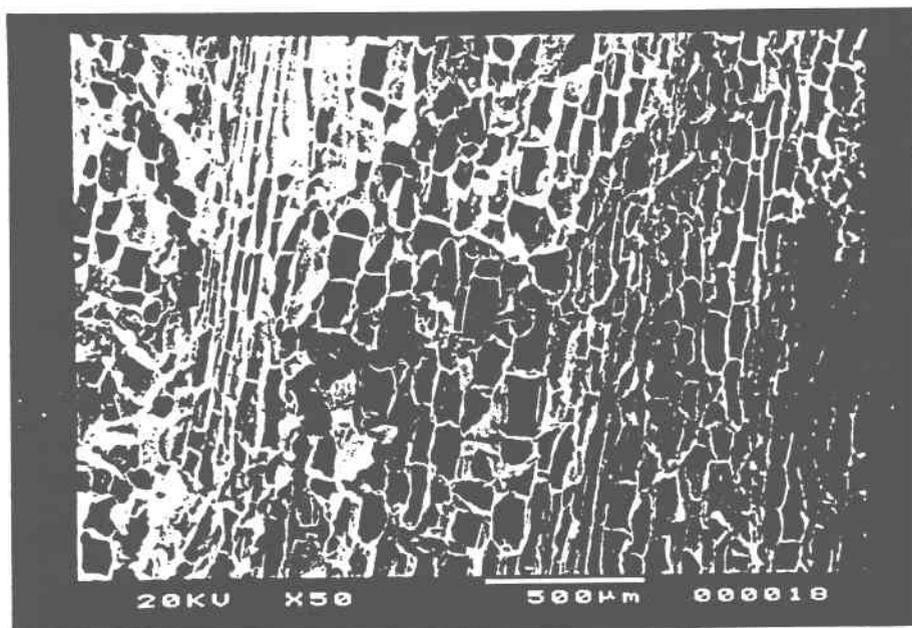


Photo 1: Ultrastructure du support de bagasse observée à un grossissement de 50 X.

La photo 1 présente l'ultrastructure du support qui est constituée de séries parallèles et juxtaposées de cavités profondes délimitées par des rebords de forme carrée ou rectangulaire. La disposition parallèle des cavités au lieu d'une disposition concentrique telle que décrite dans la littérature (Paturau, 1969) provient de la modification physique de la bagasse lors du découpage des segments de dimension spécifiée. La dimension maximale de ces cavités évaluée à partir des photos (1 et 2) se situe entre 150 et 200 μm de longueur et 100 à 150 μm de largeur. On peut dénombrer approximativement 20 à 40 cavités ou pores par cm^2 de support. Cette grande proportion de l'espace vide du support explique sa faible densité (Morgan, 1974) d'environ 0.16. La profondeur des pores n'est mesurable directement sur les photos. La forme diffère d'un pore à un autre mais elle présente en général une certaine régularité.

Les cellules se trouvent principalement à l'intérieur des pores. Leur distribution à travers l'ensemble des pores est irrégulière et aléatoire, en particulier en ce qui concerne leur densité. Deux pores voisins et sur le même horizon, peuvent contenir des densités cellulaires extrêmement différentes.

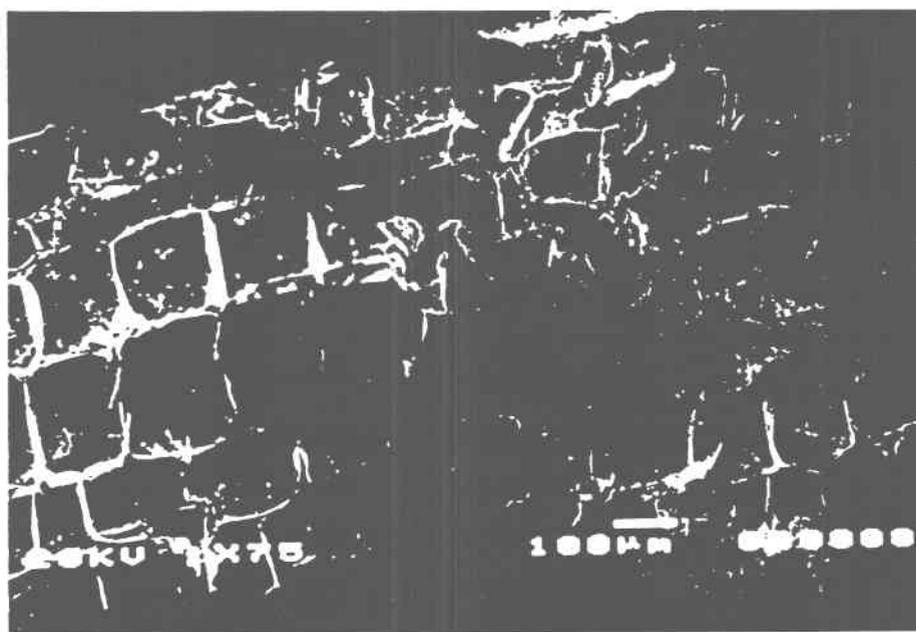


Photo 2: Ultrastructure de support de bagasse observée à un grossissement 75X

Les photos 1 et 2 montrent que seule une faible proportion des pores est saturée de cellules immobilisées. La capacité de rétention cellulaire du support

serait de beaucoup supérieure à la quantité de cellules utilisée lors de l'immobilisation, bien qu'une certaine réserve pourrait être émise concernant la perte potentielle de cellules mal adsorbées lors de la préparation du montage pour la microscopie électronique.



Photo 3: Ultrastructure de la bagasse observée à un grossissement de 1500X.

A l'intérieur des pores, les cellules semblent tapisser préférentiellement la paroi du bas, dû probablement à l'effet de la gravité. Les cellules immobilisées ne forment pas de biofilms réguliers à l'intérieur des pores, mais plutôt des réseaux denses et discontinus de cellules enchevêtrées occupant l'espace libre des pores et liés à leurs parois. Le dénombrement des cellules immobilisées est à toute fin pratique impossible à cause de la structure en amas (Photo 3). Les cellules gardent leur forme en bâtonnet, et leurs dimension moyenne est d'environ $5 \mu\text{m}$ de long et $0.5 \mu\text{m}$ de large.

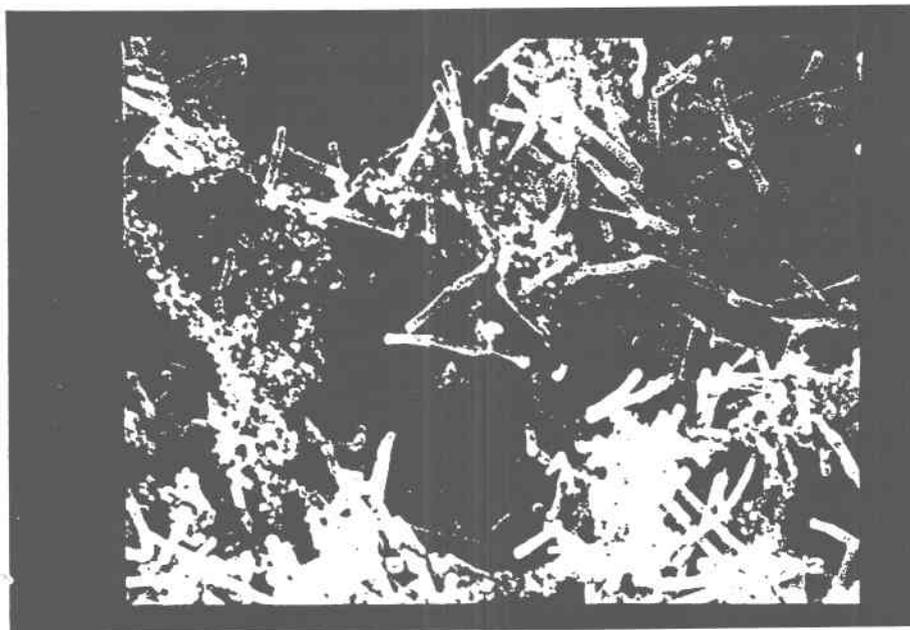


Photo 4: Ultrastructure de la bagasse observée à un grossissement de 3500 X.

Des réseaux irréguliers d'exudats polymériques glomulaires semblent intimement liés à l'amas cellulaire (photo 4). Cet exudat polymérique d'origine cellulaire semble jouer le rôle d'un ciment pour maintenir la cohésion de l'amas cellulaire. De nombreux auteurs (Kolot, 1981 ; Gerson et Zajic, 1979) soulignent le rôle éminent de cet exudat dans l'adhésion des cellules sur les supports solides, et la grande résistance au stress mécanique qu'ils leur confère. Cet effet est particulièrement recherché pour notre projet, car de hauts taux de dilution seront sollicités lors de la mise en opération en continu des bioréacteurs à cellules immobilisées, impliquant des forces de cisaillement élevées. Dans la nature la plupart des souches indigènes produisent ce type de ciment pour adhérer aux différents éléments solides tels . sable, feuille (Fletcher, 1990). Cet exudat complexe est, le plus souvent de nature polysaccharidique, appelée glycocalyx (Fletcher, 1985). Lorsque des cellules telles les lactobacilles sont cultivées par immersion en milieu liquide, il s'en suit une perte de leur capacité de synthétiser

cet exudat, qui s'accroît avec le nombre de repiquages par le jeu de la sélection génétique (Tampion, 1987). *L. helveticus* semble faire partie des cellules qui possèdent encore cette capacité de synthétiser de l'exudat polymérique, puisqu'elles adhèrent aux parois des fermenteurs et à la surface des agitateurs lors de leur culture en immersion dans un milieu liquide (Roy et al., 1988). Dans le cas de *L. bulgaricus* Hansen 2217 cette capacité semble réexprimée lors de son immobilisation sur le support solide.

3.1.2 Optimisation des paramètres d'immobilisation

Plusieurs paramètres ont été testés pour établir les conditions optimales de l'immobilisation des lactobacilles sur les copeaux de bagasse. Il s'agit de la longueur du support, le pH du milieu de culture et la température à laquelle se déroule l'immobilisation, ainsi que la durée d'exposition du support avec les cellules.

Les longueurs de support testées sont de 1.0, 1.5, 2.0 et 3.0 cm pour une largeur identique de 0.5 cm. Trois niveaux de pH ont été testés : 3, 5 et 7 ; et deux températures soit 5 et 23 °C. Les durées de mise en contact du support avec les cellules lors de l'immobilisation ont été de 1, 2 et 48 heures.

Aucune différence n'a été observée dans la quantité de cellules immobilisées entre une heure et deux heures de mise en contact du support avec les cellules. Pour la durée de 48 heures de mise en contact, de très nombreux cas de contamination ont été observés rendant la détermination de la quantité de cellules immobilisées impossible. L'espèce dominante de cette contamination est une moisissure non identifiée. L'étendue de la contamination a été beaucoup plus large à pH 7, comparativement à pH 3 et 5.

Pour évaluer la partie de l'impact, indûe à chaque paramètre en particulier, sur la quantité de cellules immobilisées, une régression linéaire de la masse des cellules libres sur chacun des paramètres, et sur des combinaisons des paramètres a été effectuée. Afin de déterminer si l'on peut affirmer, avec un degré de doute raisonnable (5%), que l'effet d'un paramètre est significatif, la statistique *t* de Student a été calculée pour chaque régression.

Les tableaux 4, 5 et 6, résument le sens de l'effet (Sens du coefficient de régression *b*). Le signe positif de l'effet indique que lorsque la valeur du paramètre analysé augmente la quantité des cellules libres augmente, par conséquent celle des cellules immobilisées diminue. Le niveau de signification de cet effet *y* est aussi rapporté.

Tableau 4: Evaluation statistique de l'effet de la température, avec ou sans combinaison des autres paramètres, sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.

Effet testé	Type Régression	Signe Régression	Statistique t
Les trois paramètres	$M = a + b_1 T^\circ + b_2 L + b_3 \text{pH}$	$b_1 < 0$	0.98
Variable explicative = T°	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 > 0$	0.93
Combinaison T° Avec pH isolé			
pH = 3	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 > 0$	0.1
pH = 5	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 < 0$	0.2
pH = 7	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 > 0$	5.5**
Combinaison T° Avec Longueur isolée			
L = 1.0 cm	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 > 0$	5.3**
L = 1.5 cm	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 < 0$	1.6
L = 2.0 cm	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 < 0$	0.5
L = 3.0 cm	$M = a + b_1 T^\circ$	$b_1 < 0$	9.3
Combinaison Température et pH	$M = a + b_1 T^\circ + b_3 \text{pH}$	$b_1 > 0$	0.2
Température et Longueur	$M = a + b_1 T^\circ + b_2 L$	$b_1 > 0$	0.1

** La valeur de t est significative à un seuil de 95%.

3.1.2.1 Effet de la température d'incubation sur l'efficacité de l'immobilisation

Le tableau 4, montre que la température d'incubation du milieu d'immobilisation n'a pas eu un effet significatif sur la quantité de cellules immobilisées qui se distingue de l'ensemble des autres paramètres expérimentaux. L'effet combiné de la température avec celui de la longueur du support n'a pas été significatif dans les conditions expérimentales utilisées, sauf pour une longueur de support de 1.0 cm. Cet effet est positif, indiquant qu'à faible température, l'immobilisation est plus forte. L'effet combiné de la température avec le pH n'a pas été significatif (95%) pour des pH de 3 et 5. A un pH de 7, l'effet de la température a été significatif (95%) et positif, indiquant qu'une plus grande quantité de cellules libres est retrouvée à la température de 21°C comparativement à 5°C. L'augmentation de la quantité de cellules immobilisées à la température de 5°C pourrait être attribuable à la promotion d'un plus grand nombre de liens hydrophobes qui sont en grande partie impliqués dans les premières étapes d'adsorption des cellules sur les supports solides (Kolot, 1981 ; Gerson et Jasic, 1979 ; Fletcher, 1990). La promotion de ces liens hydrophobes est en grande partie attribuable au ralentissement des mouvements browniens (Eisenberg et Crothers, 1979).

Tableau 5: Evaluation statistique de l'effet de la longueur, avec ou sans combinaison des autres paramètres, sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.

Effet testé	Type Régression	Signe Régression	Statistique t
Les trois paramètres	$M = a + b_1 T^\circ + b_2 L + b_3 \text{pH}$	$b_2 < 0$	0.98
Variable explicative = L	$M = a + b_2 L$	$b_2 > 0$	2.8**
Combinaison L Avec T° isolée			
$T^\circ = 5^\circ\text{C}$	$M = a + b_2 L$	$b_2 > 0$	1.0
$T^\circ = 21^\circ\text{C}$	$M = a + b_2 L$	$b_2 < 0$	2.0**
Combinaison Longueur Avec pH isolé			
pH = 3	$M = a + b_2 L$	$b_2 > 0$	0.2
pH = 5	$M = a + b_2 L$	$b_2 > 0$	0.1
pH = 7	$M = a + b_2 L$	$b_2 > 0$	0.1
Combinaison Température et pH	$M = a + b_1 T^\circ + b_3 \text{pH}$	$b_2 > 0$	0.5
Température et Longueur	$M = a + b_2 L + b_3 \text{pH}$	$b_2 > 0$	0.4

** Significatif au seuil de 95% de 95%

3.1.2.2 Effet de la longueur du support sur l'efficacité de l'immobilisation

Le tableau 5 montre que la variation de la longueur du support de 1.0 à 3.0 cm a eu un effet significatif (95%) sur la quantité de cellules immobilisées. La surface spécifique étant inversement proportionnelle à la longueur du support, la charge cellulaire doit être théoriquement plus élevée pour des supports de 1.0 cm de long comparativement aux supports de 3.0 cm. Les travaux de MooYoung *et al.* (1980) ont montré que la quantité de cellules *Saccharomyces cerevisiae* immobilisées a augmenté lorsque la surface spécifique de copeaux de bois utilisés comme support solide a augmenté. Ces résultats concordent avec ceux présentés au tableau 5. Cependant, Karel (1985) et Tampion (1987) ont avancé que la surface spécifique du support ne peut être considérée de façon isolée lors de l'immobilisation de cellules sur des supports poreux. Ils ont suggéré que l'accessibilité aux pores était un paramètre plus déterminant. Dans le cas de la bagasse, l'accessibilité des cavités pour les cellules n'est pas limitante puisqu'elles ont des dimensions beaucoup plus élevée que celles des cellules. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'impact de la longueur du support sur la quantité de cellules immobilisées en combinaison avec le pH et la température :

- La structure du support en ruche d'abeille, ainsi que sa très grande porosité peut impliquer qu'il n'y ait pas assez de différence de surface disponible entre des supports de 1.0 et 3.0 cm pour observer un impact supérieur à celui du pH.

- La quantité de cellules utilisées pour l'immobilisation est insuffisante pour saturer la surface disponible des supports de toutes les longueurs testées. Par conséquent, la longueur du support n'a pas été critiquée et n'a pas eu d'effet observable lorsque combinée avec les autres paramètres tels le pH et la température.

Tableau 6 : Evaluation statistique de l'effet du pH, avec ou sans combinaison des autres paramètres, sur l'efficacité de l'immobilisation des cellules sur le support solide.

Effet testé	Type Régression	Signe Régression	Statistique t
Les trois paramètres	$M = a + b_1 \text{ pH} + b_2 T^\circ + b_3 L$	$b_1 < 0$	0.98
Variable explicative = pH	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	21.5**
Combinaison pH Avec T° isolée			
T= 5°C	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	8.5**
T=21°C	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	15.5**
Combinaison pH Avec Longueur isolée			
L=1.0 cm	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	9.3**
L=1.5 cm	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	6.4**
L=2.0 cm	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	5.4**
L=3.0 cm	$M = a + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	9.3**
Combinaison pH et Température	$M = a + b_1 T^\circ + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	3.2**
pH et Longueur	$M = a + b_2 L + b_3 \text{ pH}$	$b_3 < 0$	3.2**

** La valeur de t est significative à un seuil de 95 %.

3.1.2.3 Effet du pH sur l'efficacité de l'immobilisation

Le tableau 6 montre que le pH a eu un effet déterminant sur la charge bactérienne du support, et cela pour les différentes combinaisons avec les autres paramètres expérimentaux. La quantité de cellules immobilisées sur le support augmente lorsque le pH du milieu passe de 3 à 5 et à 7. L'inhibition de la croissance cellulaire due au pH est levée lorsque le pH passe à 7, ce qui constituerait une première explication de l'effet observé. Cependant, cette hypothèse n'a pas beaucoup d'impact, puisque le milieu utilisé pour l'immobilisation est un milieu épuisé, qui ne peut donc supporter de croissance cellulaire. La deuxième explication, et la plus importante, est que pour un pH acide, le potentiel zéta des cellules est moins important (la charge négative étant moins forte). Par conséquent, la force motrice induisant leur adsorption sur le support inerte est plus faible, conduisant moins de cellules à l'immobilisation. Le pH a un effet direct sur les interactions électrostatiques du type Van der Waals (Kolot, 1981; Fletcher, 1985). Celles-ci sont presque exclusivement responsables de l'adsorption des cellules sur les supports solides, essentiellement dans les premières étapes de l'immobilisation (Gerson et Jasic, 1979 ; Michaux, 1982). L'impact du pH sur l'adsorption des cellules sur les supports solides est prévisible, et bien décrit dans la littérature (Kennedy et Cabral, 1983 ; Linko et Linko, 1984 ; Marshall, 1984 ; Krekeler, 1990).

L'optimisation de l'immobilisation des lactobacilles sur le support de bagasse d'après les résultats obtenus, peut être réalisée en conduisant l'immobilisation en premier lieu à un pH proche de la neutralité (pH de 5-7), à une température basse (autour de 5°C) et à une longueur faible du support (autour de 1 cm).

3.2 PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS OPÉRÉS SANS CONTRÔLE DE pH.

Le comportement dynamique des trois bioréacteurs de cellules de lactobacilles immobilisées, opérés en continu sans contrôle de pH, a été testé en vérifiant leurs performances à différents taux de dilution.

La description des performances des trois bioréacteurs sera basée sur l'évolution de la production d'acide lactique (productivité, conversion, rendement...) en fonction du taux de dilution D . Ce dernier permet de contrôler le temps de résidence du milieu nutritif dans le bioréacteur et par conséquent, la cinétique de la formation d'acide lactique. Sur les figures de 2 à 10 ; chaque point des graphiques représentant la concentration (g/l) à l'état stable (concentration constante) de l'acide lactique produit, et du lactose résiduel, est mesuré après 5 à 7 temps de rétention.

3.2.1 Bioréacteur de cellules *L.bulgaricus* Hansen 2217 immobilisées sur bagasse :

Le système de cellules *Lactobacillus bulgaricus* Hansen 2217 immobilisées sur les copeaux de bagasse, a été opéré dans une colonne de verre ayant un volume total de 230 ml, un volume réactionnel de 130 ml et une densité de biomasse immobilisée de 63 g/l (sur base humide) (Voir Tableau 3).

Les performances du système immobilisé *Lactobacillus bulgaricus* Hansen 2217 sont rapportées sur les figures 2 et 3. Les taux de dilution, basés sur le volume total du bioréacteur, se situent dans l'intervalle de 0.2 à 1.4 h⁻¹. Ils correspondent à une baisse équivalente du temps de rétention du milieu dans le bioréacteur de 5.0 heure à 43 minutes. Suite à cette baisse du temps de rétention, la quantité d'acide lactique produite par le système a baissé de 30 à 12 (g / L) et la conversion du lactose en acide lactique a chuté de 80% à 30%. Dans ces mêmes conditions d'opération du bioréacteur, la productivité du système en lactate a au contraire augmenté. La productivité (basée sur le volume total du bioréacteur) a augmenté de 9 à 15 (g / L x h) lors de l'augmentation du taux de dilution de 0.2 à 0.6 (heure)⁻¹ et à 17 (g / L x h) au taux de dilution de 1.4 h⁻¹.

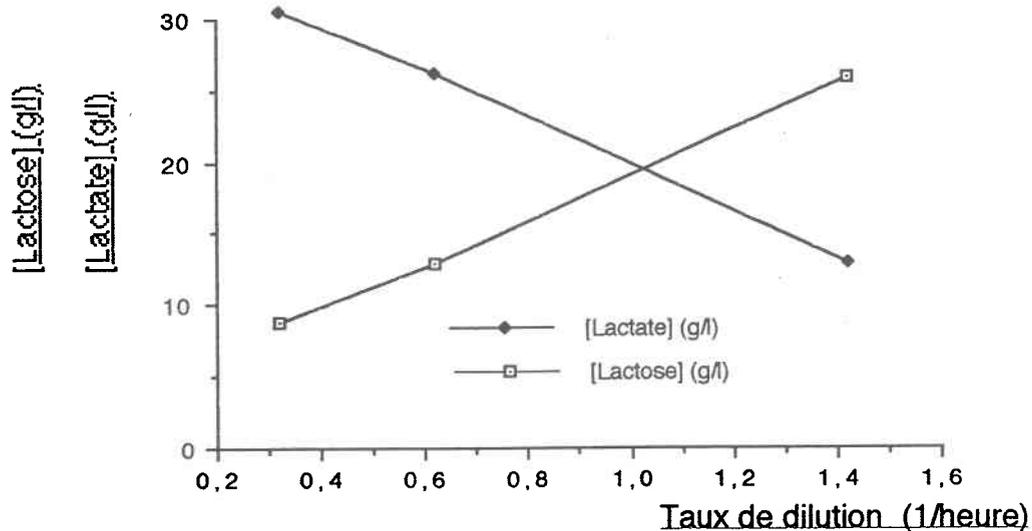


Figure 4 : Profil du substrat consommé et produit formé par *L. bulgaricus* Hansen 2217 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à $T=45^{\circ}\text{C}$ sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

L'augmentation du taux de dilution a produit un effet contraire prévisible sur la quantité de lactate générée et la productivité du système. En assumant l'hypothèse que le bioréacteur est à l'état stable, l'augmentation du taux de dilution diminue la durée du contact du substrat (lactose) avec le catalyseur (cellules), conduisant à une plus faible production de lactate. La baisse de la concentration de lactate dans le bioréacteur s'accompagne d'une augmentation de la concentration de lactose. Cet effet implique une baisse de l'inhibition, due au produit, et une plus grande disponibilité du substrat. La productivité étant le produit de la concentration de lactate par le taux de dilution. L'augmentation du taux de dilution compense la baisse de la concentration de lactate produit et le dépasse, ce qui se traduit par une productivité plus élevée. Ce phénomène a cependant une limite, qui s'exprime lors de l'approche du seuil de lessivage cellulaire. La productivité baisse rapidement au niveau de ce seuil, car le taux de dilution dépasse le taux de croissance maximal des cellules immobilisées.

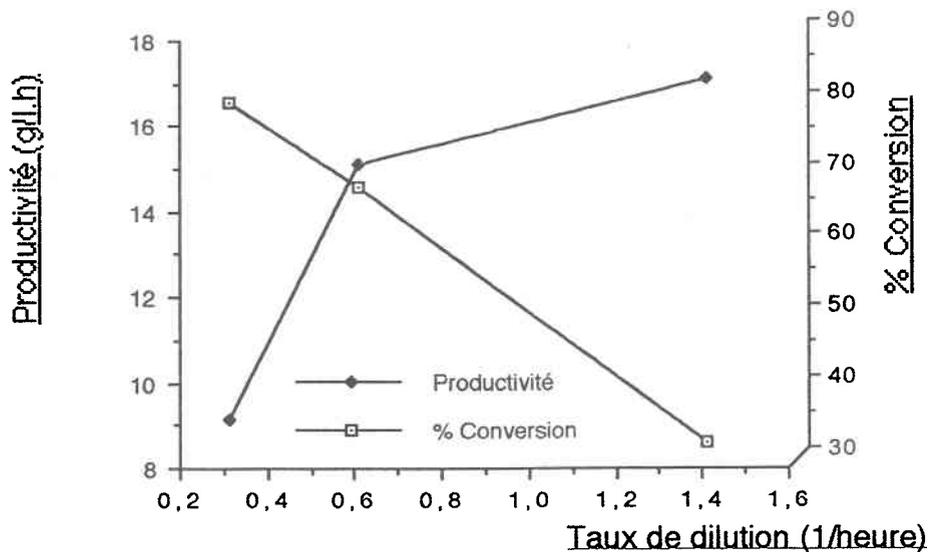


Figure 5: Profil du % de conversion du substrat consommé en produit et de la productivité de *L. bulgaricus* Hansen 2217 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à T=45°C sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

Le rendement de la conversion du lactose en acide lactique est demeuré constant à 0.98 (lactate formé/ lactose consommé) en fonction des taux de dilution utilisés. Il représente 93% de la valeur du rendement théorique (Voir Introduction). La hausse du taux de dilution (baisse du temps de rétention), n'a donc pas eu d'effet sur l'efficacité de la conversion du lactose en lactate, et a confirmé le caractère homolactique de la souche *Lactobacillus bulgaricus* Hansen 2217 lorsqu'immobilisée dans notre système.

À la concentration maximale de lactate produite de 30 (g / l), correspond la concentration minimale de lactose résiduel de 10 (g / L), au taux de dilution le plus bas de 0.2 h⁻¹. La productivité maximale de 17 (g / L x h) est au contraire obtenue au taux de dilution le plus élevé de 1.323 h⁻¹, indiquant qu'à ce taux de dilution

très élevé, il n'y a pas eu de lessivage cellulaire dans le système. Ce fait témoigne de la solidité de l'adhésion des lactobacilles sur les copeaux de bagasse, ce qui met en évidence l'efficacité de l'immobilisation.

3.2.2 Bioréacteur de cellules *L. helveticus* ATCC 10797 immobilisées :

Le système de cellules *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 immobilisées sur les copeaux de bagasse, a été opéré dans une colonne de verre ayant un volume total de 280 ml, un volume réactionnel de 172 ml et une densité de biomasse immobilisée de 58.6 g/l (sur base humide) (Voir Tableau 7).

Les taux de dilution utilisés pour ce système sont situés dans l'intervalle de 0.2 à 1.2 h⁻¹, ce qui représente une baisse du temps de rétention de 5.0 heures à 50 minutes. Les profils des performances de ce système sont rapportés dans les figures 6 et 7.

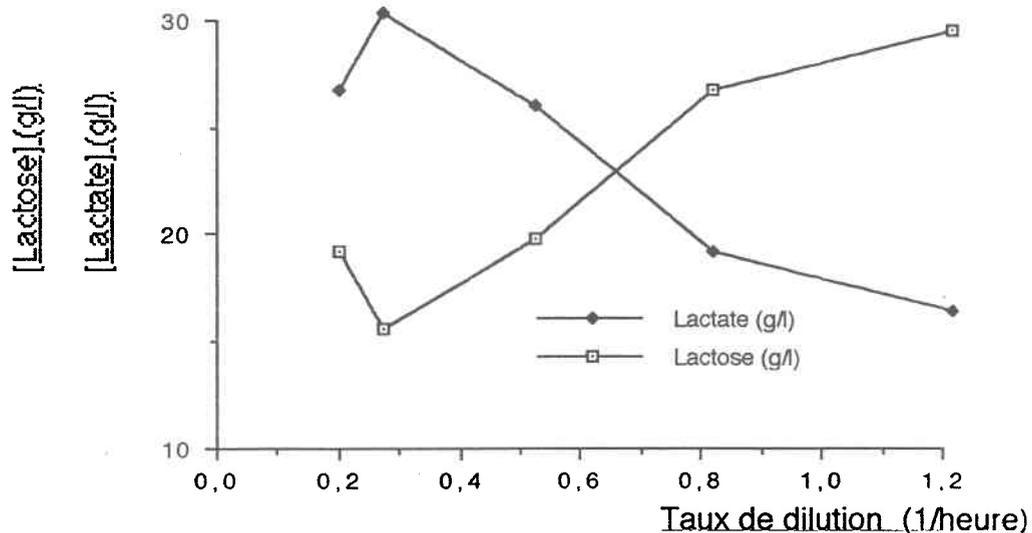


Figure 6: Profil du substrat consommé et produit formé par *L. helveticus* ATCC 10797 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à T=45°C sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

La concentration d'acide lactique produit par ce système a d'abord augmenté de 28 à 30 g/l entre les taux de dilution de 0.2 à 0.3 h⁻¹. Ce comportement peut être expliqué par un phénomène d'ordre biologique attribuable à l'adaptation physiologique des cellules immobilisées aux conditions d'opération du bioréacteur (Fletcher, 1990). Il peut être aussi expliqué par un phénomène d'ordre physique dû à une meilleure diffusion du substrat grâce à l'augmentation du taux de dilution (Atkinson et al., 1980). La concentration du lactate produit a ensuite diminué de 30 à 15 g/l avec l'augmentation du taux de dilution lorsque ce dernier est passé de 0.3 à 1.2 h⁻¹.

La conversion du lactose en lactate en fonction du taux de dilution présente le même profil que la production du lactate. Elle a augmenté de 60% à 70% entre les taux de dilution de 0.2 à 0.3 h⁻¹, pour ensuite diminuer en deçà de 40% lorsque le taux de dilution est passé de 0.3 à 1.2 h⁻¹.

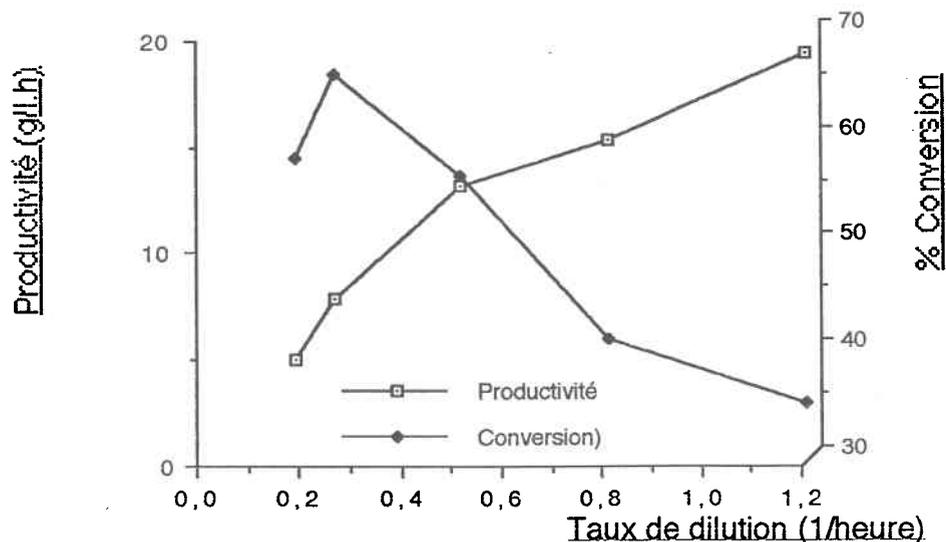


Figure 7: Profil du % de conversion du substrat consommé en produit et de la productivité de *L. helveticus* ATCC 10797 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à T=45°C sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

La productivité du système a augmenté de façon presque linéaire de 5 à 20 g/l.h avec l'augmentation du taux de dilution. Une plus forte pente pour les taux de dilution situés entre 0.2 et 0.5 h⁻¹ est observée, comparativement à celle obtenue à des taux situés entre 0.5 à 1.2 h⁻¹.

Le rendement de la conversion du lactose en acide lactique est demeuré pratiquement constant à 0.98 pour les différents taux de dilution compris entre 0.2 et 1.2 h⁻¹. Une valeur aussi élevée souligne le caractère homolactique de la souche *L. helveticus* qui a été lui aussi préservé malgré son immobilisation sur le support solide et sa mise en opération en continu.

La concentration maximale d'acide lactique produite par ce système est de 30 g/l, correspondant à la concentration minimale de lactose résiduel de 15 g/l. Cette performance est obtenue au taux de dilution le plus bas de 0.2 h⁻¹. La productivité la plus élevée obtenue est de 19 g/l.h réalisée au taux de dilution le plus élevé de 1.2 h⁻¹. Cette productivité ne correspond pas à la productivité maximale, car il n'y a pas de changement de pente dans la courbe de la productivité en fonction du taux de dilution. Des taux de dilution plus élevés devraient être utilisés, mais le dispositif expérimental ne pouvait s'y prêter.

3.2.3 Bioréacteur de cellules *L.bulgaricus* ATCC 11842 immobilisées.:

Le système de cellules *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 immobilisées sur les copeaux de bagasse, a été opéré dans une colonne de verre ayant un volume total de 250 ml, un volume réactionnel de 150 ml et une densité de biomasse immobilisée de 77.4 g/l (sur base humide) (Voir Tableau 7).

Les taux de dilution utilisés pour ce système sont situés dans l'intervalle de 0.11 à 1.8 h⁻¹, ce qui représente une baisse du temps de rétention de 8.9 heure à 30 minutes. Le profil des performances est rapporté dans les figures 6 et 7.

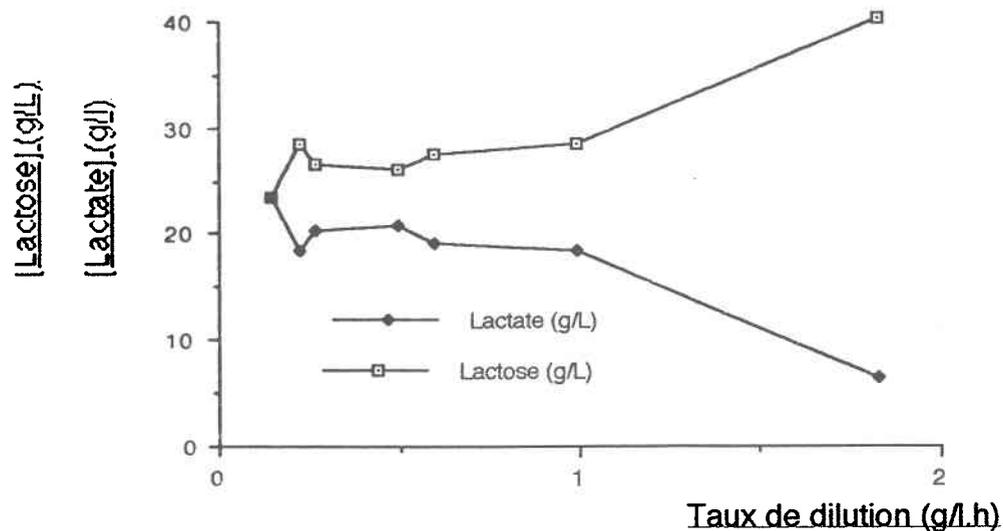


Figure 8. Profil du substrat consommé et produit formé par *L. bulgaricus* ATCC 11842 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à T=45°C sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

Entre le taux de dilution de 0.1 et 0.19 h⁻¹, la concentration d'acide lactique produite par le système a baissé rapidement de 22.45 g/l à 17 g/l. Elle s'est ensuite stabilisée autour de 18 g/l dans l'intervalle de 0.19 à 0.96 h⁻¹ pour chuter à 5 g/l dans l'intervalle de 0.96 à 1.8 h⁻¹. Le plateau atteint par la concentration du lactate dans l'intervalle de dilution de 0.19 à 0.96 h⁻¹ indique qu'il y a peu ou pas d'effet de la dynamique de l'écoulement du liquide de fermentation sur les performances du système. Deux hypothèses peuvent être principalement retenues pour expliquer ce phénomène. La première concerne le biocatalyseur, dont la productivité serait améliorée par l'effet d'une sélection génétique au cours du fonctionnement du bioréacteur dans le temps, résultant en la production de cellules produisant plus de lactate et/ou résistant mieux à l'effet inhibiteur du lactate et de l'acidité. Ce phénomène de sélection génétique a été décrit par de nombreux chercheurs (Harder et Kuenen, 1977 ; Lelieveld, 1982 ; Dykhuizen et Hartl, 1983 ; Anonyme, 1983), et concerne particulièrement la fermentation en continu. La seconde hypothèse, qui n'exclue pas la première, concernerait l'amélioration de la diffusion du substrat vers les cellules immobilisées grâce à l'augmentation du taux de dilution de 0.19 à 0.96 h⁻¹. Cette amélioration résulterait d'une certaine fluidisation du lit fixe des cellules immobilisées, due à la pression du fluide, se traduisant par l'allègement de la compaction du support (Atkinson et al., 1980). La concentration de lactate produit par le système a chuté de 5 g/l lorsque le taux de dilution est passé de 0.96 à 1.8 h⁻¹. Malgré cette baisse importante de lactate produit, il n'y a pas eu de lessivage cellulaire, comme l'indique la quantité de lactate toujours produite à ce taux de dilution.

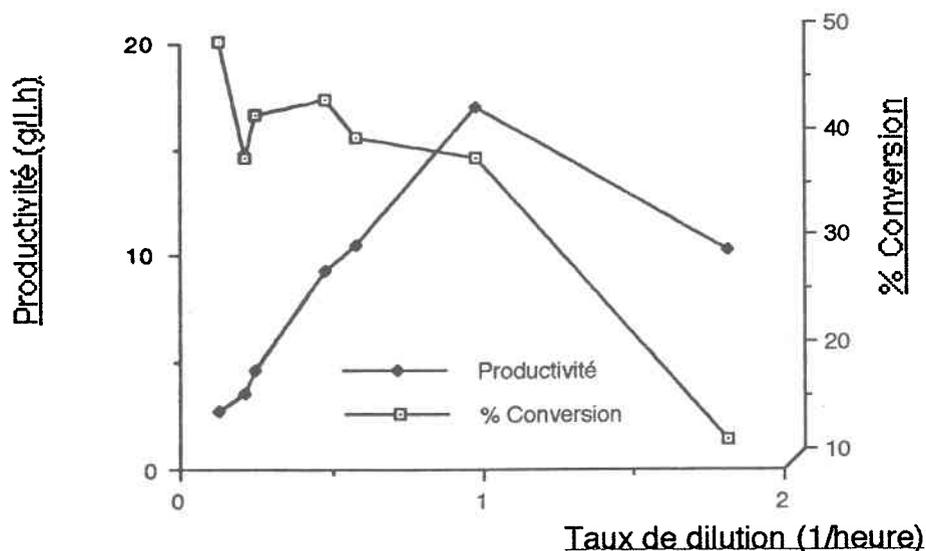


Figure 9: Profil du % de conversion du substrat consommé en produit et de la productivité de *L. bulgaricus* ATCC 11842 immobilisé sur bagasse et opéré en continu à T=45°C sans contrôle de pH, à différents taux de dilution.

La productivité du système a augmenté de façon pratiquement linéaire de 2.5 à 16.7 g/l.h avec l'augmentation du taux de dilution dans l'intervalle de 0.112 à 0.96 h⁻¹. Elle a ensuite baissé à 10 g/l.h lorsque le taux de dilution est passé de 0.96 à 1.8 h⁻¹. Cette baisse de la productivité confirme qu'à un taux de dilution supérieur à 0.96 h⁻¹, le système s'approche de ses limites de fonctionnement, soit des conditions de lessivage total des cellules.

La conversion du lactose en lactate est passée de 50% à 40% entre les taux de dilution de 0.112 à 0.196 h⁻¹, pour ensuite se situer autour de 42 % pour les taux de dilution de 0.196 à 0.96 h⁻¹. Elle a ensuite baissée drastiquement en deçà de 15 % lorsque le taux de dilution est passé de 0.96 à 1.8 h⁻¹, indiquant l'approche des limites de capacité du bioréacteur.

La concentration maximale d'acide lactique produite par ce système est de 24.5 g/l, et correspond à une concentration minimale de lactose résiduel de 24.5 g/l, au taux de dilution le plus bas de 0.11h^{-1} . La productivité maximale de 16.7 g/l.h est obtenue au taux de dilution de 0.96h^{-1} .

Le rendement de la conversion du lactose en lactate est demeuré constant à près de 0.98. Le caractère homolactique de la souche est conservé, malgré l'immobilisation sur le support solide. Cette souche présente donc la même performance que les deux autres espèces de lactobacilles.

Tableau 7: Paramètres physiques et performances des trois bioréacteurs de cellules lactobacilles immobilisées sur la bagasse, opérés sans contrôle de pH et à température de 45°C.

Paramètres	L. bulgaricus Hansen 2217	L. helveticus ATCC 10797	L. bulgaricus ATCC 11842
Colonne			
V_t (ml)	230	280	250
V_r (ml)	130	172	150
H (cm)	16.0	—	—
D (cm)	4.5	4.5	4.5
Support base sèche (g)	14.5	16.4	19.4
Xi (g)	14	16	19
Si (g/l)	37	45	45
μ max (h ⁻¹)	0.48	0.50	0.40
Y (g lactate/ g lactose)	0.98	0.98	0.98
Productivité max			
V_t (g/l.h)	17 / 1.3**	19 / 1.287	16.7 / 0.96
V_r (g/l.h)			
V_s (g/l.h.g)	1.172 / 1.3	1.158 / 1.287	0.86 / 0.96
P_{max} (g/l)	30 / 0.2	30 / 0.3	22.45 / 0.11
Conversion max (%)	80 / 0.2	70 / 0.3	50 / 0.11

3.2.4 Comparaison des performances des trois Souches de lactobacilles immobilisées :

Les deux espèces *L. helveticus* ATCC 10797 et *L. bulgaricus* Hansen 2217 ont produit la concentration maximale d'acide lactique la plus élevée de 30g/l, parmi les trois souches de lactobacilles immobilisées et opérées en système continu dans des bioréacteurs sans contrôle de pH. Cette performance a été réalisée par les deux espèces à des taux de dilution voisins soient respectivement 0.3 et 0.2 h⁻¹. Le maximum de lactate produit par l'espèce *L. bulgaricus* ATCC 11842 est de 22g/l, obtenu au taux de dilution de 0.11h⁻¹, ce qui est faible comparativement aux performances des deux espèces *L. bulgaricus* Hansen 2217 et *L. helveticus* ATCC10797. Les bioréacteurs étaient physiquement similaires, opérés dans des conditions identiques. L'explication de ces différences observées réside dans les cellules elles-mêmes. Les deux souches *L. bulgaricus* appartenant à la même espèce, on constate cependant des différences importantes concernant la production de lactate, et des autres performances, ormis un rendement de conversion similaire de 0.98 g lactate /g lactose. Ces différences sont d'autant plus intéressantes qu'une autre espèce *L. helveticus*, présente des performances similaires à celle de *L. bulgaricus* Hansen 2217. La détermination taxonomique basée sur des critères très précis (similarité chromosomique, physiologique et morphologique) n'implique pas un comportement identique de souches de la même espèce par rapport à l'utilisation d'un substrat dans un milieu donné, dans un contexte physique donné.

Une partie de ce constat peut être expliqué par le fait que la capacité de métaboliser le lactose en lactate est attribuable à une activité plasmidique (Boyaval, 1989). Les plasmides pouvant plus facilement subir des modifications (par perte ou mutation) ce qui pourrait expliquer en partie que deux souches de la même espèce de *L. bulgaricus* peuvent avoir un comportement différent vis à du lactose. La souche Hansen 2217 est reconnue par de nombreux auteurs (Mehaia et Cheryan, 1987; Mehai et Cheryan, 1986; Steiber et Gerhardt, 1981; Cox et MacBean, 1977) pour sa capacité à produire des quantités de lactate plus élevées que la moyenne. Quant aux deux espèces ATCC, la suprématie de *L. helveticus* sur *L. bulgaricus* peut être aussi attribuable à sa meilleure utilisation du galactose (Cogan, 1987 ; Kandler, 1983 ; Desmazeaud. 1983).

Le comportement de souches de la même espèce peut être très différent lors de leur immobilisation. Il est donc nécessaire de réaliser des essais expérimentaux sur les cellules immobilisées afin de choisir la souche à utiliser, sans se baser uniquement sur les caractéristiques décrites dans la littérature pour une espèce donnée de microorganismes.

Parmi les paramètres quantifiant les performances d'un réacteur, la productivité est le plus important du point de vue pratique (Brodelius et Vandamme ; Atkinson, 1986 ; Birnbaum, 1986 ; Chibata et al., 1983 ; Bucholtz, 1982).

C'est le système *L. helveticus* ATCC 10797 qui présente la performance la plus élevée, avec une productivité de 19 g/l.h au taux de dilution de 1.29 h⁻¹, suivi de *L. bulgaricus* Hansen 2217 avec une productivité de 17.4 g/l.h au taux de dilution de 1.3 h⁻¹ (Voir Tableau 3). La productivité la plus faible de 16.7 g/l.h est obtenue par le système *L. bulgaricus* ATCC 11842 au taux de dilution le plus faible de 0.96 h⁻¹.

Cette comparaison de la productivité n'est cependant pas tout à fait exacte car elle ne tient pas compte de la quantité de cellules immobilisées. Une quantité plus élevée de cellules dans le bioréacteur résulterait d'une productivité plus élevée. Sur la base de la productivité spécifique, le système *L. bulgaricus* Hansen 2217 et le système *L. helveticus* ATCC 10797 présentent pratiquement la même productivité maximale, soit respectivement 1.17 et 1.16 (g.l⁻¹.h⁻¹ / g de biomasse) obtenus à des taux de dilution voisins correspondant respectivement à 1.3 et 1.29 h⁻¹. Le système *L. helveticus* ATCC 10797 présente une productivité spécifique qui augmente de façon linéaire avec le taux de dilution (Figure 8). Ce comportement indique que la productivité de ce système s'est améliorée vers les hauts taux de dilution comparativement à celle de *L. bulgaricus* Hansen 2217 qui était plus élevée aux taux de dilution les plus bas (0.2 h⁻¹) pour ensuite atteindre un plateau vers les taux de dilution élevés.

Cette différence de comportement dynamique de la productivité des deux systèmes pourrait trouver une explication si la sensibilité de la souche *L. helveticus* ATCC 10797 à l'acide lactique était plus élevée que celle de la souche *L. bulgaricus* Hansen 2217. Vers les hauts taux de dilution, la concentration du lactate produit diminue, ce qui permettrait à la souche *L. helveticus* ATCC 10797 de rattrapper les performances de *L. bulgaricus* Hansen 2217. Des expériences concernant cette différence potentielle de sensibilité à l'acide lactique entre ces deux souches devraient être réalisées pour vérifier cette hypothèse.

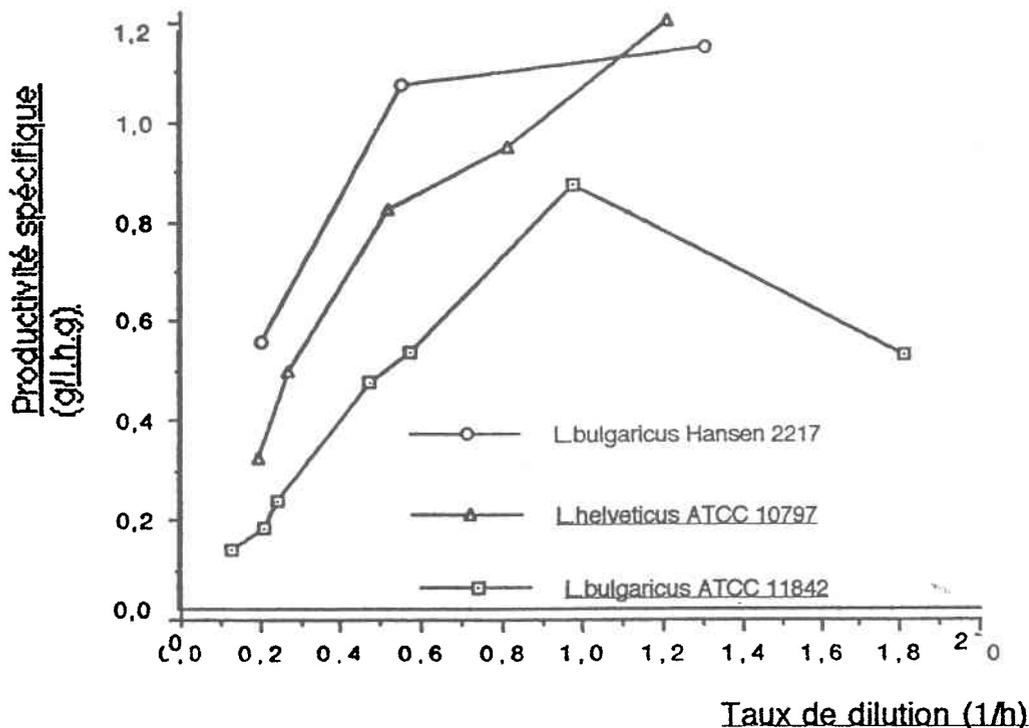


Figure 10: Productivité spécifique des trois souches de lactobacilles pour différents taux de dilution

Le rendement de la bioconversion du lactose en lactate pour les trois souches est très élevé, soit de 0.98 g lactate / g lactose (Voir Figure 9). Cette performance est maintenue même aux taux de dilution les plus extrêmes. Le maintien d'un rendement élevé vers les bas taux de dilution indique que la voie du catabolisme subséquent du lactate en acides organiques volatils indésirables tel l'acide acétique et du CO₂ n'a pas été favorisée. Le catabolisme plus poussé du lactate est dû à l'activité de lactates déshydrogénases ou lactate oxydases, et il est observé chez des lactobacilles (London, 1968 ; Cogan, 1988). Vers les hauts taux de dilution, c'est la stabilité génétique des trois souches utilisées qui est démontrée, plus particulièrement en ce qui concerne la stabilité des plasmides. La différence observée entre le rendement théorique de 1.05 g lactate / g lactose avec

le rendement expérimental de 0.98 g lactate / g lactose obtenu pour les souches peut être attribuable à l'utilisation d'une partie du lactose comme source de carbone pour les différentes réactions anaboliques des cellules. Une autre partie (très faible) peut être dérivée dans les différents sentiers métaboliques pour donner des produits secondaires.

Le rendement très élevé obtenu lors de cette expérience atteste de la qualité physiologique élevée des trois souches utilisées. Il indique que le caractère homofermentaire est conservé même après l'immobilisation des cellules sur le support solide, ainsi qu'au cours de l'opération en continu du système immobilisé. L'immobilisation des cellules sur le support solide n'a donc pas d'effet négatif sur leur physiologie et le produit obtenu est de très haute qualité comme l'atteste le peu ou l'absence de produits secondaires.

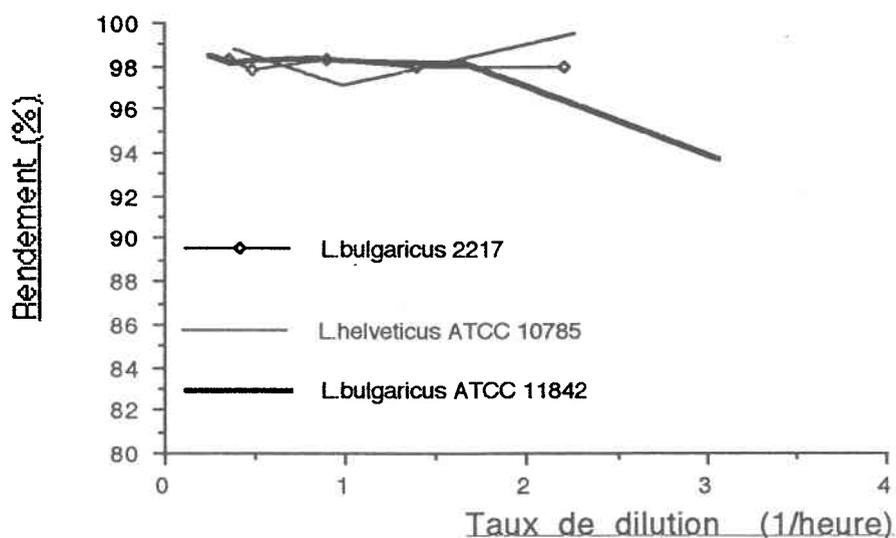


Figure 11. Profil du rendement (g Lactate produite / g Lactose initial) en %, calculé pour les souches de lactobacilles immobilisées, pour les différents taux de dilution utilisés.

3.3 PERFORMANCES DES BIORÉACTEURS DE LACTOBACILLES IMMOBILISÉES OPÉRÉS AVEC UN CONTRÔLE DE pH

Tableau 8: Paramètres physiques et performances des deux bioréacteurs de cellules lactobacilles immobilisées sur la bagasse, opérés avec contrôle de pH et à température de 45°C.

Paramètres	L. bulgaricus Hansen 2217	L. helveticus ATCC 10797
Colonne		
V_t (ml)	285	285
V_r (ml)	105	105
H (cm)	22	22
d (cm)	4.5	4.5
Support base sèche (g)	17	17
Si (g/l)	45	45
Xi (g)	17	17
μ max (h ⁻¹)	0.48	0.50
Pmax (g/l)	35 / 0.33	38 / 0.33
Conversion max (%)	87	84
Y (g lactate/g lactose)	0.98	0.98
Productivité V_t (g/l.h)	19 / 1.12	26 / 1.49
Productivité V_r (g/l.h)	50.6	69.3
Prod. spécifique (g/l.h.g)	1.3	1.5

Chacune des deux espèces de lactobacilles, *L.helveticus* ATCC 10797 et *L.bulgaricus* Hansen 2217, a été immobilisée sur des copeaux de bagasse, et disposée alternativement avec des lits de granules de CaCO_3 pour garnir des colonnes en verre (Matériel et méthodes). Le CaCO_3 ajouté joue le rôle de tampon, et permet de contrôler le pH. Le pH est alors situé entre 4.6 - 4.9 durant la fermentation comparativement à une valeur de 3.6 enregistrée dans les bioréacteurs sans contrôle de pH.

Le comportement dynamique des deux bioréacteurs opérés avec contrôle de pH, est suivi en testant leurs performances à différents taux de dilution. Cette dynamique comporte deux phases consécutives: la fluctuation des performances (concentration de lactate, productivité et bioconversion) dans le bioréacteur lors du changement du taux de dilution qui représente l'état instable, suivit par la stabilisation de ces performances dans le temps qui caractérise l'état stable.

Les performances de ces deux bioréacteurs sont décrites sous forme de profil dans le temps de la concentration du lactose, du lactate (Figures 12 et 13, 16 et 17) ainsi que celui de la productivité et du pourcentage de conversion du substrat initial (Figures 14 et 15, 18 et 19) pour les différentes hauteurs du bioréacteur et les différents taux de dilution utilisés.

3.3.1 Cellules de *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 immobilisées :

Le bioréacteur de cellules *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 (17 g, base humide), immobilisées sur les copeaux de bagasse (17 g), a été opéré en continu dans une colonne ayant 285 ml de volume total, un volume réactionnel de 105 ml et une densité de biomasse (base humide) immobilisée de 59.6 g/L (Tableau 8). Les granules de carbonate de calcium (100 g) ont été disposées- en couches alternant avec les lits de cellules immobilisées à différents niveaux de la colonne (Voir Figure3 dans la section Matériel et méthodes) .

Les taux de dilution (basés sur le volume total de la colonne), sous lesquels a été opéré le bioréacteur, se situent dans l'intervalle de 0.2 à 1.1 h^{-1} . Ils

correspondent à une baisse du temps de rétention du milieu dans le bioréacteur de 300 à 54 min.

Les figures 12 à 15 présentent le profil dynamique et transitoire des performances du bioréacteur en fonction du taux de dilution et de la hauteur du bioréacteur durant le temps d'opération.

Le profil de la production du lactate et du lactose converti est présenté aux figures 12 et 13. Au taux de dilution de 0.2 h^{-1} , la quantité d'acide lactique produite en fonction de la durée d'opération, présente un profil qui varie avec la hauteur du bioréacteur. Aux hauteurs H1 et H2, la quantité moyenne de lactate est constante sur une période de 15 heures d'opération avec des concentrations respectives de 13.7 et 15.7 g/l. Pendant cette même période, la quantité de lactate a baissé respectivement de 25 à 20 g/l et de 27 à 25 g/l au niveau des hauteurs H3 et H4. Cette baisse peut être attribuée à la désorption de cellules libres actives à ces hauteurs lors de la mise en oeuvre du bioréacteur. L'implication en premier lieu des zones les plus élevées du bioréacteur est due au mode d'alimentation ascendant du perméat de lactosérum. Globalement, la quantité de lactate a augmenté (de 13 à 25 g/L) avec la hauteur du bioréacteur (4 à 22 cm). Après 15 heures d'opération, le taux de dilution a été augmenté de 0.20 à 0.33 h^{-1} . A l'état de transition entre 15 et 20 heures d'opération, la quantité de lactate a baissé de 14 à 11 g/L au niveau de H1, alors qu'elle a augmenté au niveau de H2, H3 et H4, passant respectivement de 15 à 21 g/L, 20 à 26 g/L et 25 à 28 g/L.

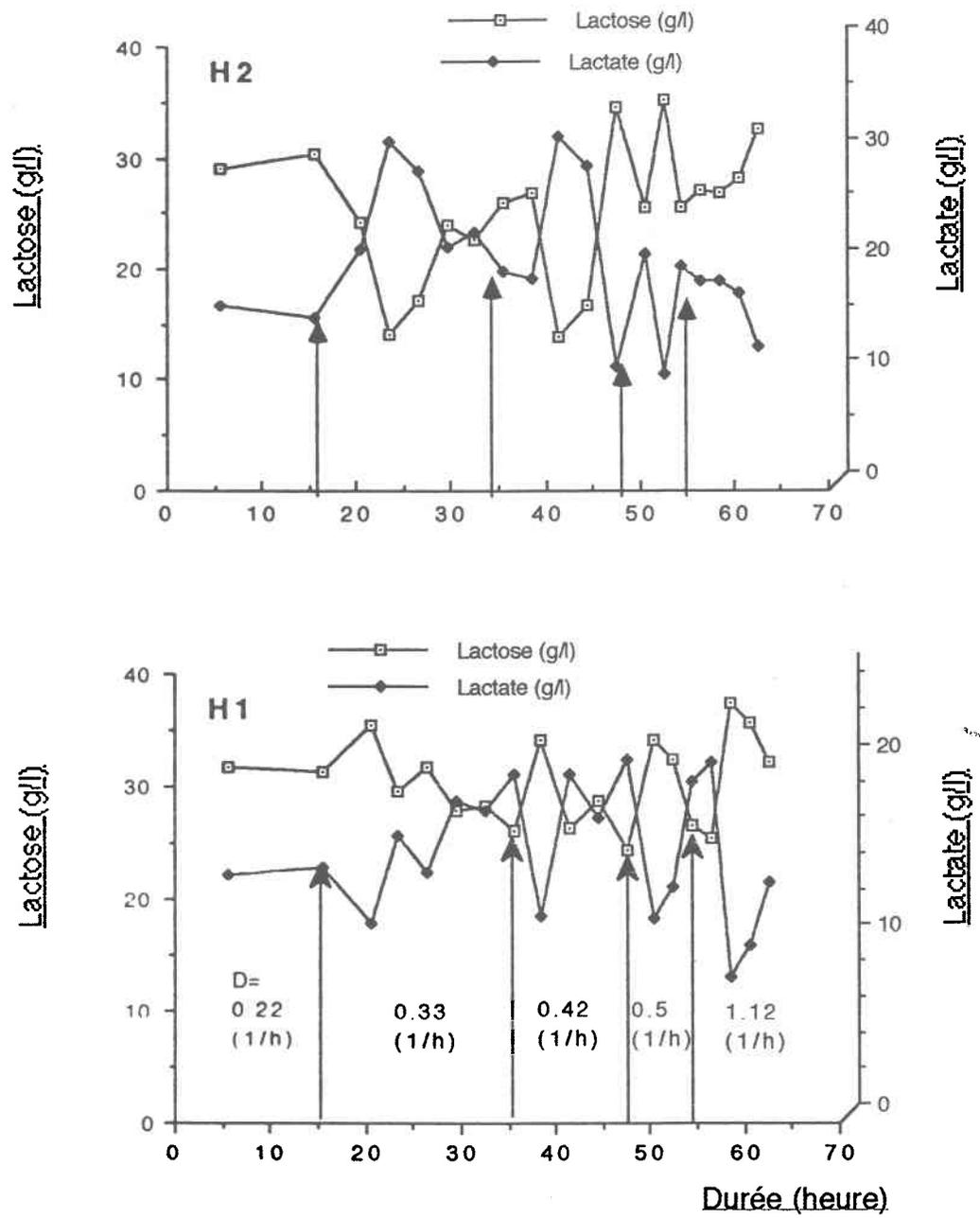


Figure12 : Profil de la concentration de lactose converti et de lactate produit à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur de *L. helveticus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3

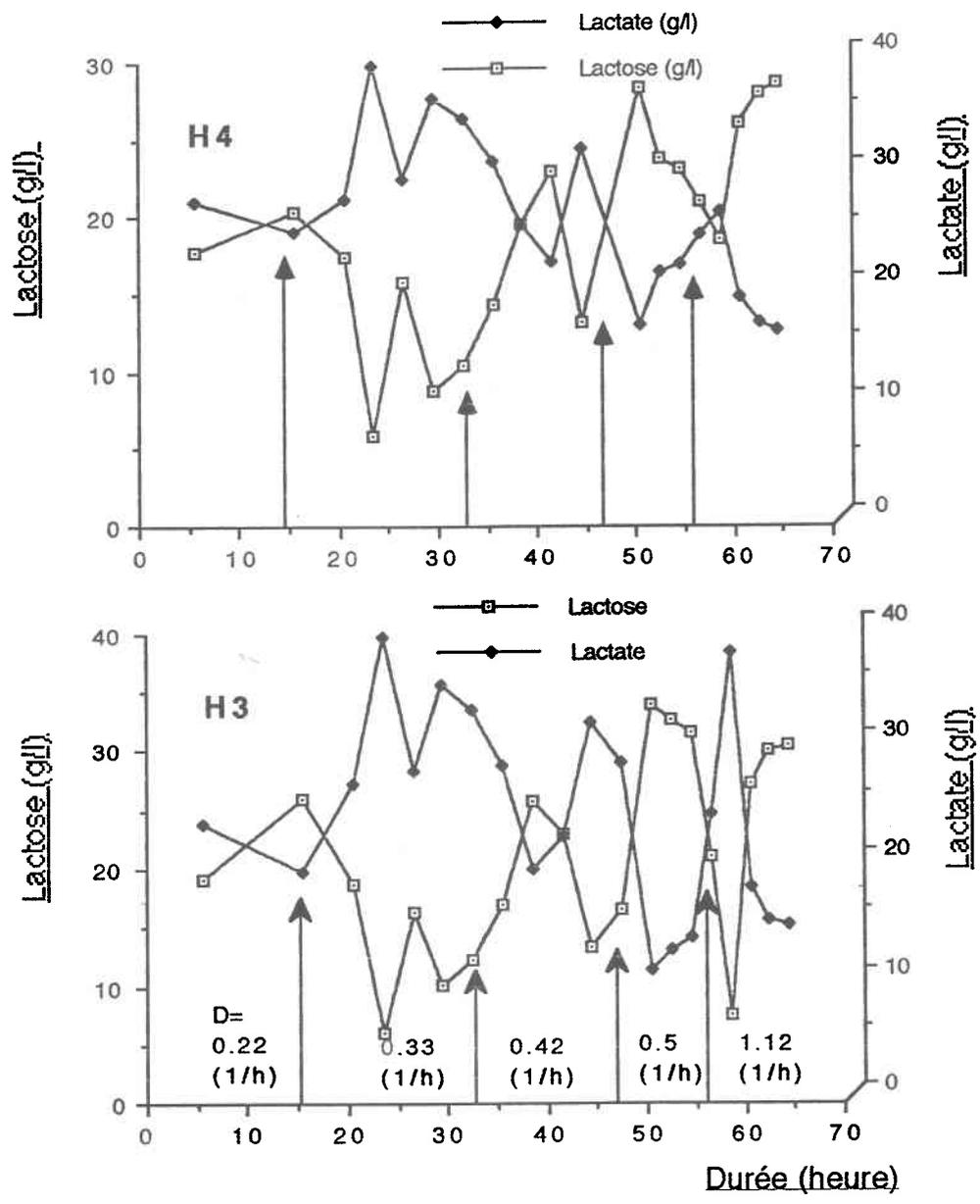


Figure13 : Profil de la concentration de lactose converti et de lactate produit à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur de *L.helveticus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

La quantité de lactate s'est ensuite stabilisée à la hauteur H1 à 17 g/L après une période de 9 heures d'opération à $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$. Aux hauteurs H2, H3 et H4, la concentration maximale de lactate a atteint respectivement 31, 38 et 39 g/L pour ensuite baisser dans le même ordre à 28 et 29 et 29 g/L après 3 heures supplémentaires d'opération (Figures 12 et 13). La baisse a été plus importante au niveau de H3 et H4. Le pic décrit par la concentration de lactate indique un état instable généré par l'activité des cellules libres. Ces dernières sont probablement désorbées de la base du bioréacteur sous l'effet choc du changement du taux de dilution. La concentration s'est finalement stabilisée à ces mêmes hauteurs autour de 21, 34 et 35 g/L après 12 heures d'opération.

La perturbation introduite par le changement du taux de dilution de $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$ à $D = 0.42 \text{ h}^{-1}$ a induit le même profil dynamique du lactate au niveau des différentes hauteurs du bioréacteur. A ce taux de dilution, le lactate à la hauteur H1 a d'abord baissé à 11 g/L, pour augmenter et se stabiliser autour de 20 g/L pendant toute la durée d'opération (9 heures). Aux hauteurs H2, H3 et H4, les concentrations de lactate correspondantes de 31, 35 et 36 g/L ont chuté aux environs de 22 g/L pour ces trois hauteurs, indiquant un arrêt de la conversion du lactose entre H2 et H4 durant la phase de transition (Figures 12 et 13). L'effet combiné du lessivage partiel des cellules à la hauteur de H3 et H4, ainsi que l'inhibition due au lactate produit à la base du bioréacteur peut être à l'origine de l'arrêt de conversion entre H2 et H4. La concentration du lactate a ensuite rapidement augmenté pour atteindre environ 32 g/L aux hauteurs de H2, H3 et H4 après 9 heures d'opération. La quantité de lactate produite à $D = 0.42 \text{ h}^{-1}$ comparativement à $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$ a diminué aux hauteurs H3 et H4 (32 g/L versus 36 g/L), alors qu'elle est demeurée constante aux hauteurs H1 et H2. L'effet supplémentaire de rétention par filtration de cellules au niveau de H1 et H2 explique ce comportement. Cet effet est dû au compactage du support sous l'impact de la pesanteur qui est plus important à la base du bioréacteur qu'au niveau de H3 et H4. De plus, à ces hauteurs, les cellules subissent un effet combiné de désorption et d'inhibition dû à la plus grande quantité de lactate qui y aboutit.

Lorsque $D = 0.5$, la concentration de lactate a baissé fortement aux environs de 11 g/L aux hauteurs H1 à H3 et 17 g/L à la hauteur H4 (Figures 12 et 13). Une certaine homogénéisation du milieu a donc été établie dans le bioréacteur suite à la perturbation provoquée par le changement du taux de dilution. Cette baisse a persisté durant 6 heures d'opération, indiquant un ralentissement de l'adaptation des cellules aux perturbations des conditions d'opération du bioréacteur. Le ralentissement peut être dû à l'approche du taux maximum de croissance des cellules dans ce système. La concentration a ensuite rapidement augmenté pour atteindre environ 20 g/L au niveau de H1 et H2, et 24 g/L au niveau de H3 et H4.

L'état de transition établi lorsque le taux de dilution a été augmenté de 0.42 à 0.50 h^{-1} a présenté le même profil que lorsque a été augmenté de 0.33 à 0.42 h^{-1} (Figures 12 et 13). En effet, la concentration de lactate est demeurée constante aux hauteurs H1 et H2 (20 g/L) alors qu'elle a fortement diminué aux niveaux H3 et H4. Le gradient de lactate dans le bioréacteur est réduit de façon importante suite à la baisse de la production de lactate vers les hauteurs H3 et H4.

A $D = 1.12 \text{ h}^{-1}$, la concentration de lactate a baissé de façon significative à la hauteur de H1 pour atteindre 5.8 g/L lors de l'étape de transition. Au niveau de H2, H3 et H4 la baisse est moins prononcée, mais elle a progressé régulièrement durant les 12 heures d'opération pour atteindre environ 15 g/L, alors qu'au niveau de H1 la concentration de lactate a graduellement augmenté pour atteindre 13 g/L (Figures 12 et 13). Le gradient de la concentration de lactate dans le bioréacteur est pratiquement nul, indiquant que la presque totalité de l'activité catabolique est localisée au niveau de la base du bioréacteur. Le lessivage des cellules immobilisées aux niveaux supérieurs du bioréacteur, ainsi que l'effet inhibiteur plus marqué du lactate, expliquent ce résultat.

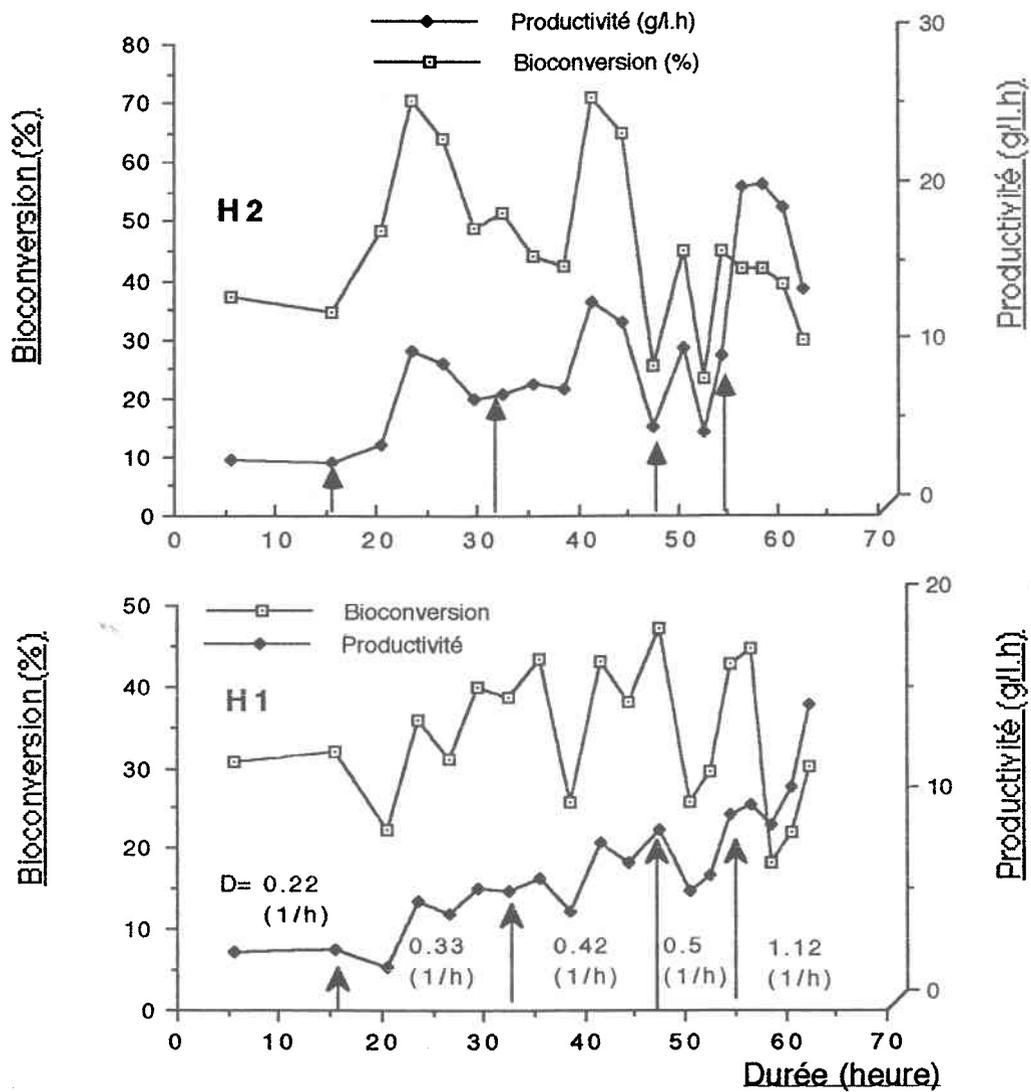


Figure14 : Profil de la productivité et du % de bioconversion à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur de *L.helveticus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

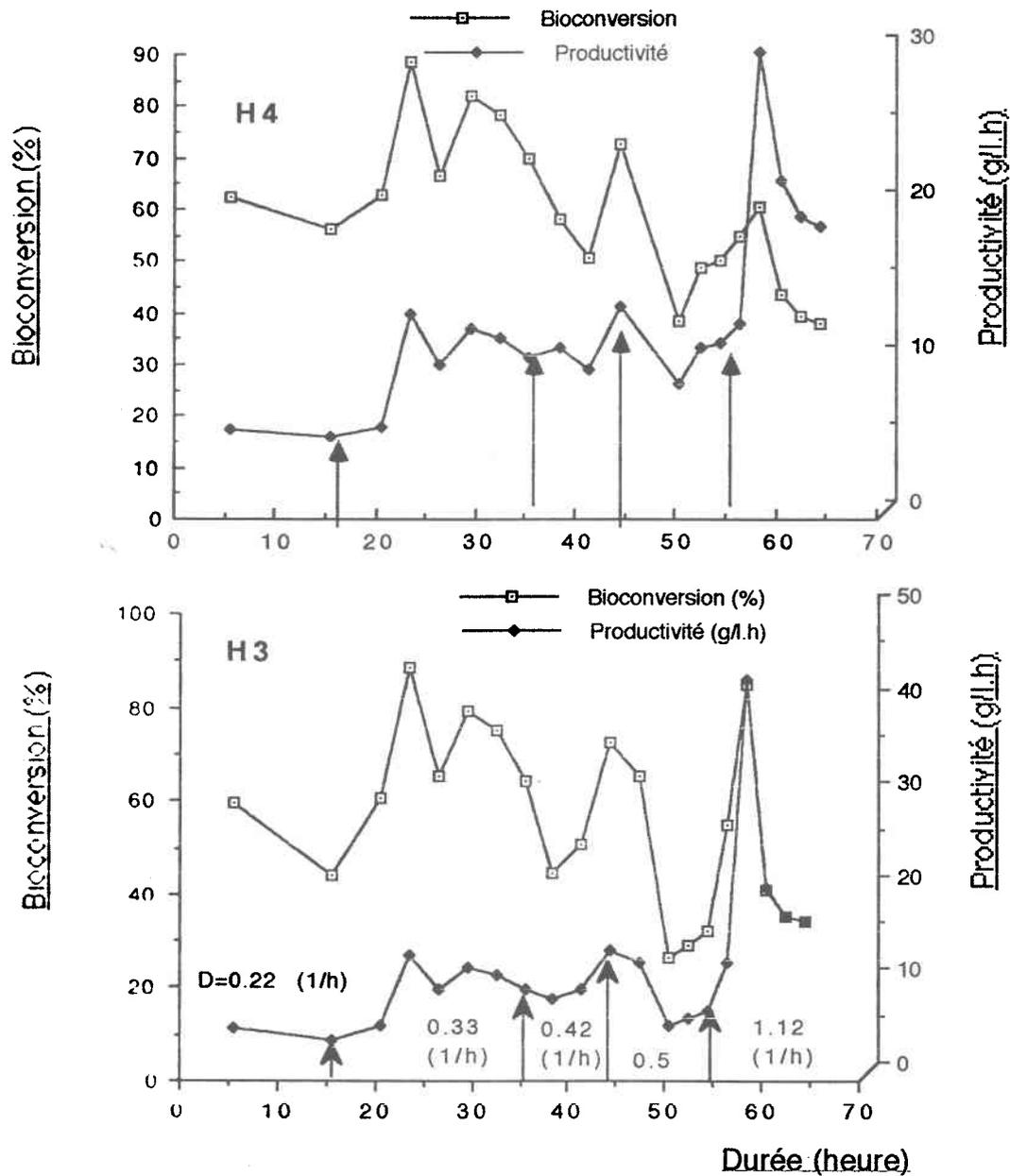


Figure 15 Profil de la productivité et du % de bioconversion à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur de *L.helveticus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

Le rendement de la conversion du lactose en lactate est de 0.98, soit l'équivalent de 93% du rendement théorique (tableau 8) . Ce rendement très élevé démontre bien que le caractère homofermentaire de la souche *L.helveticus* ATCC 10797 est conservé. Le profil de la concentration du lactose dans le temps en fonction de la hauteur du bioréacteur et du taux de dilution correspond exactement à l'inverse de celui de la concentration du lactate.

La productivité en acide lactique montre un gradient qui augmente avec la hauteur du bioréacteur pour les différents taux de dilution (Figures 14 et 15). Au taux de dilution de 0.2 h^{-1} , la productivité a augmenté de 2.7 à 5.5 g/L.h en passant de H1 à H4. La répartition de la productivité en fonction de la hauteur, est demeurée constante sauf au niveau de H3 où elle a baissé de 5.3 à 3.9 g/L.h. Cette baisse est probablement dûe à une désorption de cellules actives à ce niveau.

A l'état de transition subséquent au changement du taux de dilution de 0.2 à 0.33 h^{-1} , le gradient de la productivité de 2.0-5.5 g/L.h obtenu entre H1 et H4 n'a pas beaucoup changé (Figures 14 et 15). Il n'y a eu de baisse qu'au niveau de H1 (2.0 au lieu de 2.7), alors qu'au niveau de H2 et H3 la productivité est demeurée constante. Le déplacement des cellules libres de la hauteur H1 vers H2 et H3 suite à une certaine expansion du lit fixe expliquerait cette baisse.

Après 6 heures d'opération au taux de dilution de 0.33 h^{-1} , la productivité a doublé systématiquement à toutes les hauteurs du bioréacteur, en maintenant le même profil de répartition (Figures 14 et 15). Ce fait révèle un délai d'adaptation relativement rapide des cellules, équivalent à trois générations de divisions. Le gradient de la productivité est alors situé entre 5 et 11 g/L.h. Après 15 heures d'opération, le gradient de la productivité s'est stabilisé à 6-12 g/L.h entre H1 et H4. La productivité a doublé entre H1 et H2, passant de 5.6 à 10 g/L.h, pour ensuite augmenter légèrement à 12 g/L.h entre H3 et H4. L'augmentation du taux de dilution de 0.2 à 0.33 a permis de doubler le gradient de la productivité dans le bioréacteur. La hausse de la productivité est essentiellement réalisée dans la première moitié du bioréacteur.

Le changement du taux de dilution de 0.33 à 0.42 h^{-1} a produit une baisse du gradient de la productivité qui est passée de 6-12 g/L.h à 4.7-9.4 g/L.h (Figures 14 et 15). Cette baisse est conséquence au délai d'adaptation des cellules aux

nouvelles conditions d'opération du bioréacteur. Après trois heures d'opération, la productivité a doublé au niveau de H1, pour atteindre 8 g/L.h. Dans la section du bioréacteur entre H2 et H3, elle est restée constante, indiquant qu'il n'y a pas eu d'activité catabolique. Au niveau de H4, la productivité a augmenté brusquement à 10.8 g/L.h. Après une durée d'opération située entre 9 et 12 heures, la productivité est demeurée constante à 8 g/L.h au niveau de H1, alors qu'elle a augmenté pour atteindre 13 g/L.h au niveau de H2. Entre H2 et H4 la productivité n'a pas évolué, indiquant qu'il n'y a pas eu de conversion de lactose au niveau de H3 et H4. La presque totalité de l'activité cellulaire se situe donc entre H1 et H2, ce qui représente un profil identique à celui obtenu aux taux de dilution de 0.2 et 0.33 h⁻¹. La productivité a augmenté de près de 2 g/L.h à D = 0.42 h⁻¹ comparativement à D = 0.33 h⁻¹, et ceci à toutes les hauteurs du bioréacteur.

L'état de transition lors du changement du taux de dilution de 0.42 à 0.5 h⁻¹ s'illustre par une baisse du gradient de productivité de 8-13 g/L.h à 5-8 g/L.h (Figures 14 et 15). Après 3 heures d'opération, il a augmenté à 6-11 g/L.h pour se stabiliser à 10-12.3 g/L.h après 9 heures d'opération. Le gradient de productivité a baissé comparativement à celui obtenu au taux de dilution de 0.42 h⁻¹. Le gradient plus faible indique que l'activité cellulaire est localisée essentiellement à la base du bioréacteur soit entre H1 et H2 comme cela a été le cas à D = 0.42 h⁻¹. Ce profil est le résultat combiné de l'effet inhibiteur du lactate sur les cellules dont la concentration est plus élevée entre H3 et H4, de la quantité plus faible de lactose disponible, et d'une désorption des cellules actives plus probable à ces niveaux.

Le changement du taux de dilution de 0.5 à 1.12 h⁻¹ a baissé la productivité de 10 à 6.5 g/L.h au niveau de H1, par contre entre H2 et H4, elle a augmenté de 20 à 29 g/L.h (Figures 14 et 15). Ce sont la productivité et le gradient de productivité les plus élevés observés pour ce système. Après 12 heures d'opération, le gradient de productivité a baissé à 15-19 g/L.h. L'essentiel de la conversion a eu lieu entre H1 et H2, où plus de 80% de la productivité est générée.

Pour tous les taux de dilution testés lors de la mise en oeuvre de ce bioréacteur, exception faite pour D = 0.2 h⁻¹ coïncidant avec l'étape de démarrage, la presque totalité de la productivité est générée entre H1 et H2. Peu ou pas de productivité est générée entre H3 et H4, exception faite durant les phases de

transition. Ce comportement serait le résultat d'une part de la quantité plus faible de lactose disponible entre H3 et H4 comparativement à H1 et H2, et d'autre part de la quantité plus élevée de lactate au niveau de H3 et H4 ce qui implique une inhibition plus importante due au produit .

Le pourcentage de conversion du lactose initial en acide lactique pour différents taux de dilution en fonction du temps (Figures 14 et 15) suit un profil semblable à celui du lactate produit. La conversion du lactose en lactate a lieu essentiellement entre H1 et H2, pour les mêmes raisons que celles avancées pour analyser la productivité de ce même bioréacteur, soit : l'impact négatif sur l'activité des cellules de la baisse de la concentration de lactose et de l'augmentation de la concentration du lactate en fonction de la hauteur de la colonne.

Au taux de dilution le plus bas de 0.22 h^{-1} , le pourcentage de conversion est de 60% , alors qu'il atteint une valeur plus élevée de 87% à $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$ (Tableau 8).

Le pourcentage de conversion doit théoriquement baisser avec l'augmentation du taux de dilution. L'effet contraire observé expérimentalement s'explique essentiellement par la rhéologie du milieu de fermentation dans le bioréacteur. L'augmentation du taux de dilution implique une augmentation des forces de cisaillements du liquide de fermentation et de sa pression, ce qui a provoqué une certaine expansion du lit fixe. Ce fait se traduit par une amélioration du transfert de masse, résultant en une meilleure disponibilité du substrat et de sa conversion. Une amélioration de l'activité cellulaire due à la sélection de souches plus performantes peut aussi expliquer en partie cet effet observé. L'augmentation du taux de dilution à $D = 0.42 \text{ h}^{-1}$, a provoqué la baisse du pourcentage de conversion du lactose à une valeur de 71%. Cette observation indique que les vertus de l'expansion partielle du lit fixe de cellules immobilisées dans le bioréacteur ont une limite qui est rapidement dépassée par l'effet de dilution engendré par les débits plus élevés du milieu de fermentation. Ainsi à $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$, le pourcentage de conversion baisse à 54%, et à $D = 1.12 \text{ h}^{-1}$, il atteint 40%.

3.3.2 Cellules de Lactobacillus bulgaricus Hansen 2217 immobilisées

Le système de cellules *Lactobacillus bulgaricus* Hansen 2217 (17 g. base humide) immobilisées sur les copeaux de bagasse (17 g), a été conçu exactement comme celui des cellules *Lactobacillus helveticus* ATCC 10797 immobilisées et opérées avec contrôle de pH. Il a été opéré en continu dans une colonne ayant 285 ml de volume total, un volume réactionnel de 105 ml et une densité de biomasse immobilisée de 59.6 g/L (Tableau 8). Les taux de dilution (relatifs au volume total de la colonne) sous lesquels a été opéré le bioréacteur sont compris dans l'intervalle de 0.33 à 1.49 h⁻¹. Ils correspondent à des temps de rétention situés entre 198 min et 40 min.

Le bioréacteur a été mis en oeuvre au taux de dilution initial de 0.33 h⁻¹. Après 6 heures d'opération à ce taux de dilution, la quantité de lactate produite a augmenté de façon très marquée (Figures 16 et 17). Sa concentration a quadruplé au niveau de H2 passant de 6 à 27 g/L.h, alors qu'aux niveaux H3 et de H4, cette quantité a doublé passant respectivement de 14 à 31 g/L.h et de 18 à 32 g/L. Au niveau de H1, la concentration de lactate est restée constante et faible à 4 g/L, et n'a augmenté qu'après 9 heures d'opération pour atteindre 12 g/L. La forte amélioration de la production de lactate peut être attribuée à l'activation des cellules dormantes (l'immobilisation étant réalisée à une température de 10°C), à l'attrition des cellules mortes du biofilm et surtout à la rétention des souches les plus performantes par sélection génétique. Après 9 heures d'opération, la production de lactate a atteint un état stable, où le gradient de concentration est de 12 à 38 g/L entre H1 et H4. Ce gradient très élevé est essentiellement localisé entre H1 et H3, reflétant la zone la plus active cataboliquement du bioréacteur.

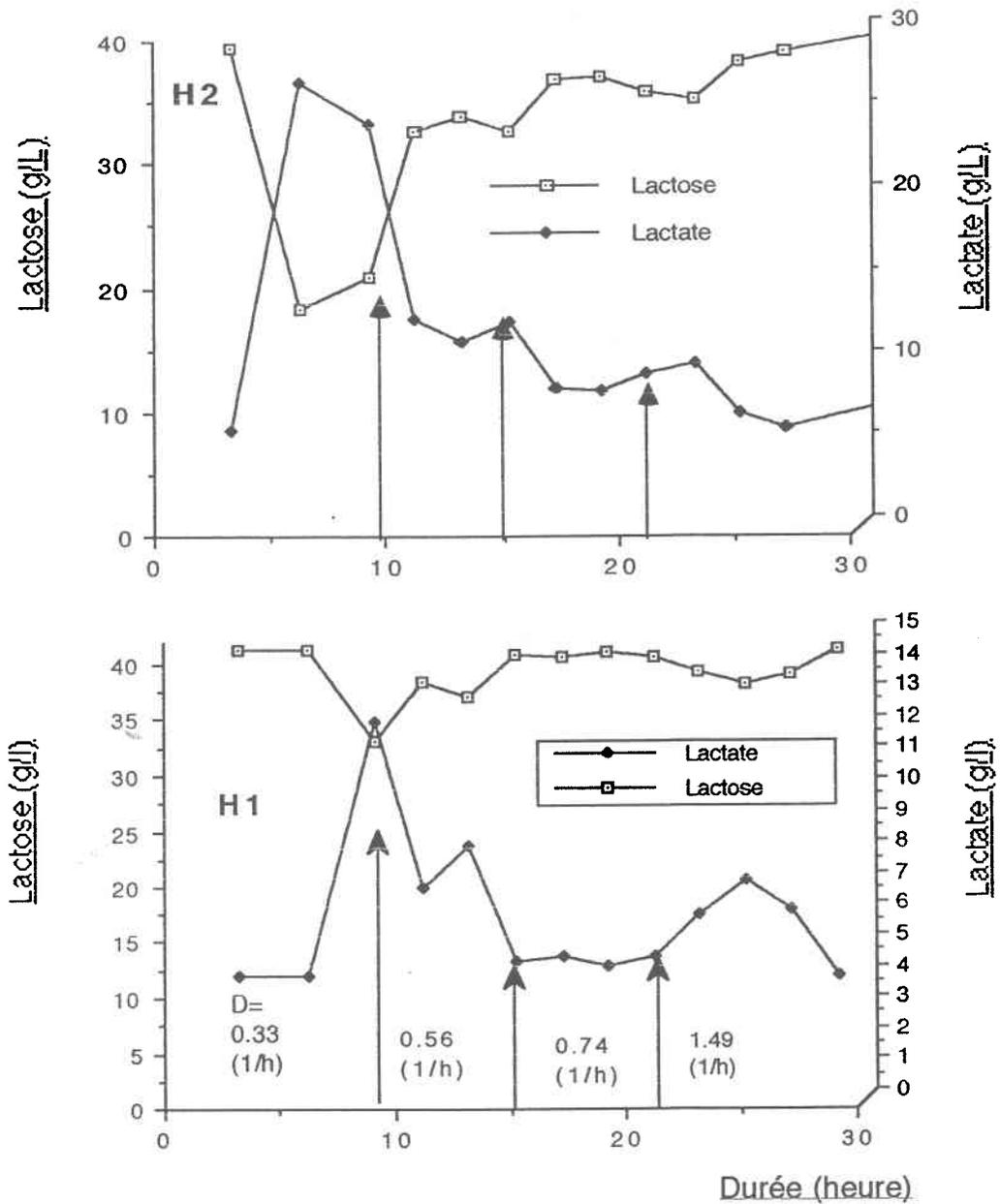


Figure 16 : Profil de la concentration de lactose converti et de lactate produit à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

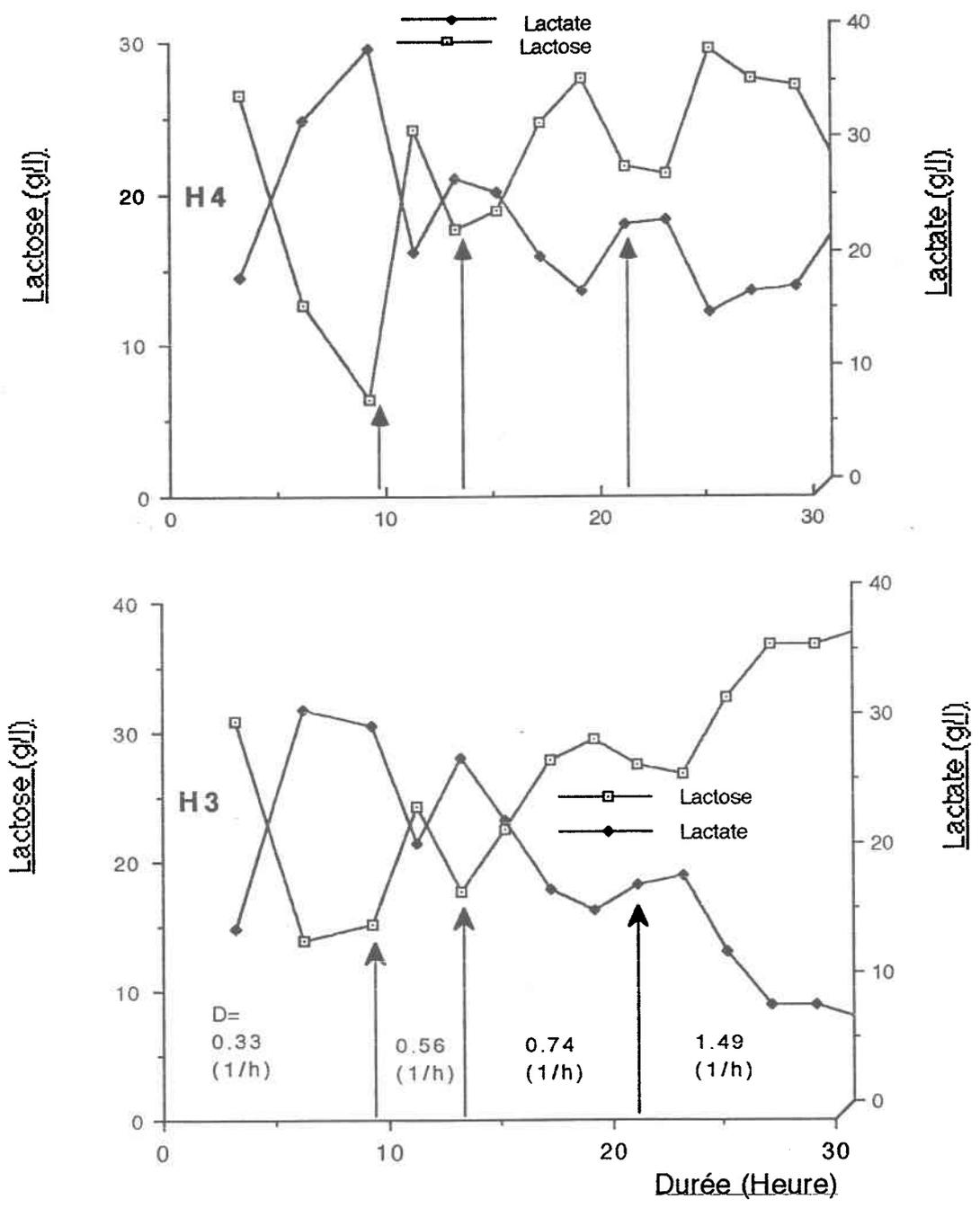


Figure 17.: Profil de la concentration de lactose converti et de lactate produit à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

Le changement du taux de dilution de 0.33 à 0.56 h^{-1} , s'est traduit par une baisse instantanée du lactate à toutes les hauteurs du bioréacteur (Figures 16 et 17). Une baisse de moitié du lactate produit au niveau de H1 et H2 avec respectivement la diminution de la concentration de 12 à 7 g/L et de 24 à 12 g/L . Cette baisse est plus prononcée comparativement à celle enregistrée entre H3 et H4, qui a été du tiers, avec une diminution de la concentration de lactate de 31 à 20 g/L aux deux niveaux. L'atténuation de la baisse de la concentration du lactate au niveau de H3 peut être dûe à un transfert relatif et partiel de cellules libres actives de H2 vers H3. Après 6 heures d'opération à ce taux de dilution, le lactate a augmenté à tous les niveaux du bioréacteur. L'état stable de la production de lactate a été établi entre 6 heures et 9 heures d'opération du bioréacteur à ce taux de dilution. Le gradient de lactate dans le bioréacteur, est alors de $6-26 \text{ g/L}$ entre H1 et H4. Ce gradient est aussi élevé que celui généré au taux de dilution de 0.33 h^{-1} , indiquant la constance de la stratification dans le bioréacteur des cellules immobilisées pour ces deux taux de dilution. L'essentiel de l'activité catabolique des cellules, localisé entre H1 et H3, constitue donc la zone la plus active métaboliquement indépendamment du taux de dilution.

Le changement du taux de dilution de 0.56 à 0.74 h^{-1} , s'est aussi traduit par la baisse du lactate à toutes les hauteurs du bioréacteur, sauf au niveau de H1 où la concentration est demeurée constante (Figures 16 et 17). La baisse a été de près de 5 g/L à toutes les autres hauteurs du bioréacteur. Après 6 heures d'opération à $D=0.74 \text{ h}^{-1}$, la quantité de lactate n'a augmenté qu'au niveau de H4, où il y a eu probablement une contribution des cellules libres provenant des niveaux plus bas, qui s'ajoute à l'activité des cellules immobilisées à ce niveau. L'état stable de production de lactate obtenu après 6 heures d'opération, a été maintenu à l'intérieur de 12 heures d'opération à ce taux de dilution. Le gradient de lactate à $D = 0.74 \text{ h}^{-1}$ de $4-24 \text{ g/L}$ entre H1 et H4 est équivalent à ceux obtenus aux taux de dilution précédents et décrit le même profil dynamique.

Le changement du taux de dilution de 0.74 à 1.49 h^{-1} a induit la baisse du lactate à toutes les hauteurs du bioréacteur, sauf au niveau de H1 où il a augmenté de 4.8 à 6 g/L (Figures 16 et 17). Cette amélioration s'est maintenue dans le temps. Considérant le taux de dilution très élevé utilisé, cette amélioration serait attribuable à l'atténuation du compactage du support à cette hauteur, ce qui

permettrait un meilleur transfert de masse. L'état stable s'est installé 3 heures seulement après l'état de transition. Le gradient de lactate dans le bioréacteur est alors de 6.3-18 g/L. Il est plus faible que ceux générés par les taux de dilution précédents, et le profil dynamique de la production de lactate est différent. L'essentiel du gradient localisé entre H3 et H4, indique que l'activité catabolique a lieu presque uniquement au niveau de H1 et de H4. L'activité au niveau de H1 est probablement due à la plus grande quantité de cellules normalement immobilisées à la base du bioréacteur et la plus grande quantité de lactose disponible. Au niveau de H4, la contribution des cellules détachées des niveaux H2 et H3 serait responsable de l'augmentation de la concentration de lactate.

La quantité maximale de lactate produite est de 38 g/L, obtenue au taux de dilution de 0.33 h^{-1} (Tableau 8).

Le rendement de la conversion du lactose en lactate par *Lactobacillus bulgaricus* Hansen 2217 est aussi de 0.98 soit 93% du rendement théorique (Tableau 8). Le caractère homofermentaire des cellules immobilisées est donc conservé. Le profil de la concentration du lactose est dans ce cas aussi exactement l'image inverse de celle de la concentration du lactate.

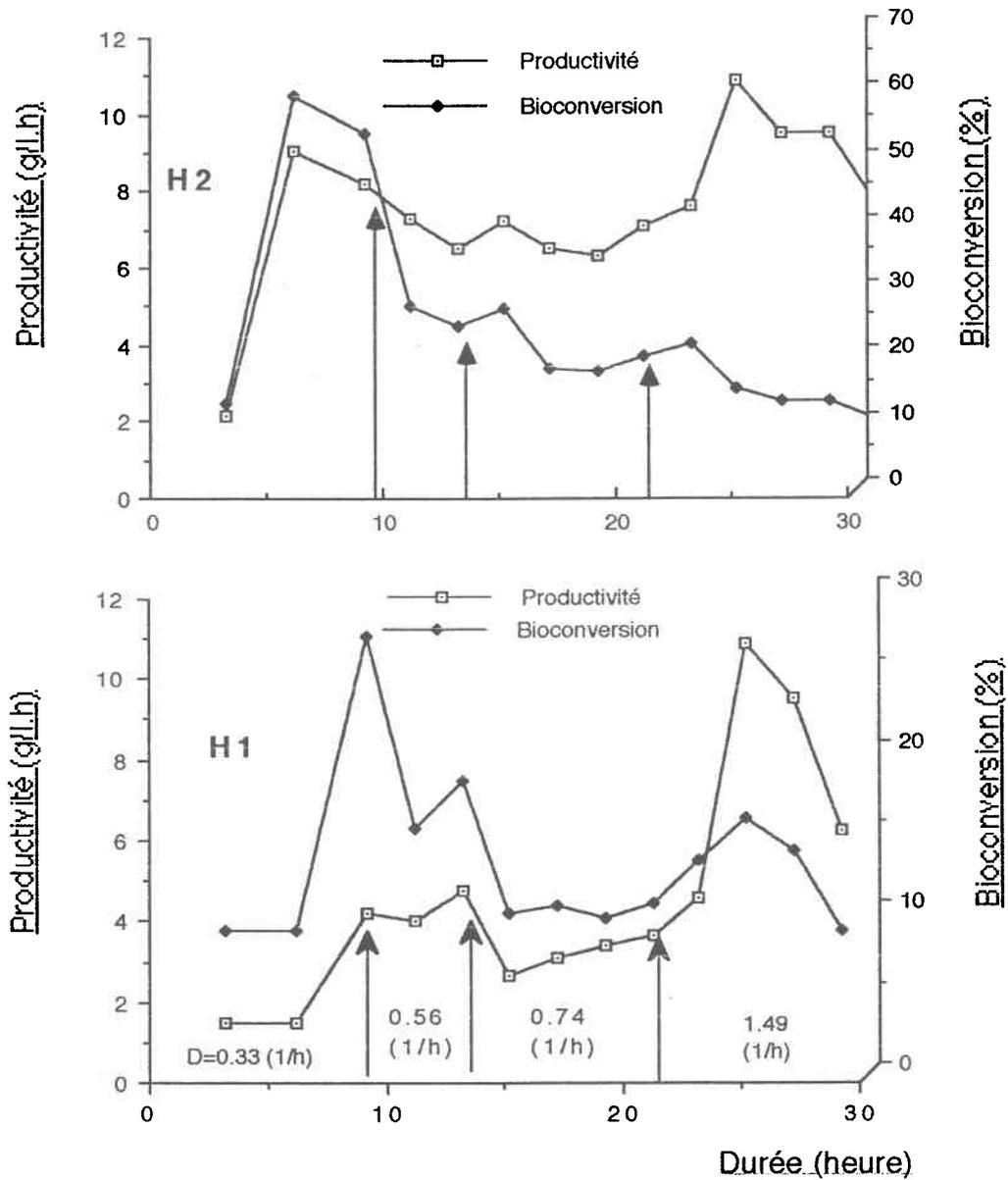


Figure 18.: Profil de la productivité et du % de bioconversion à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H1 et H2 du bioréacteur de *L. bulgaricus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

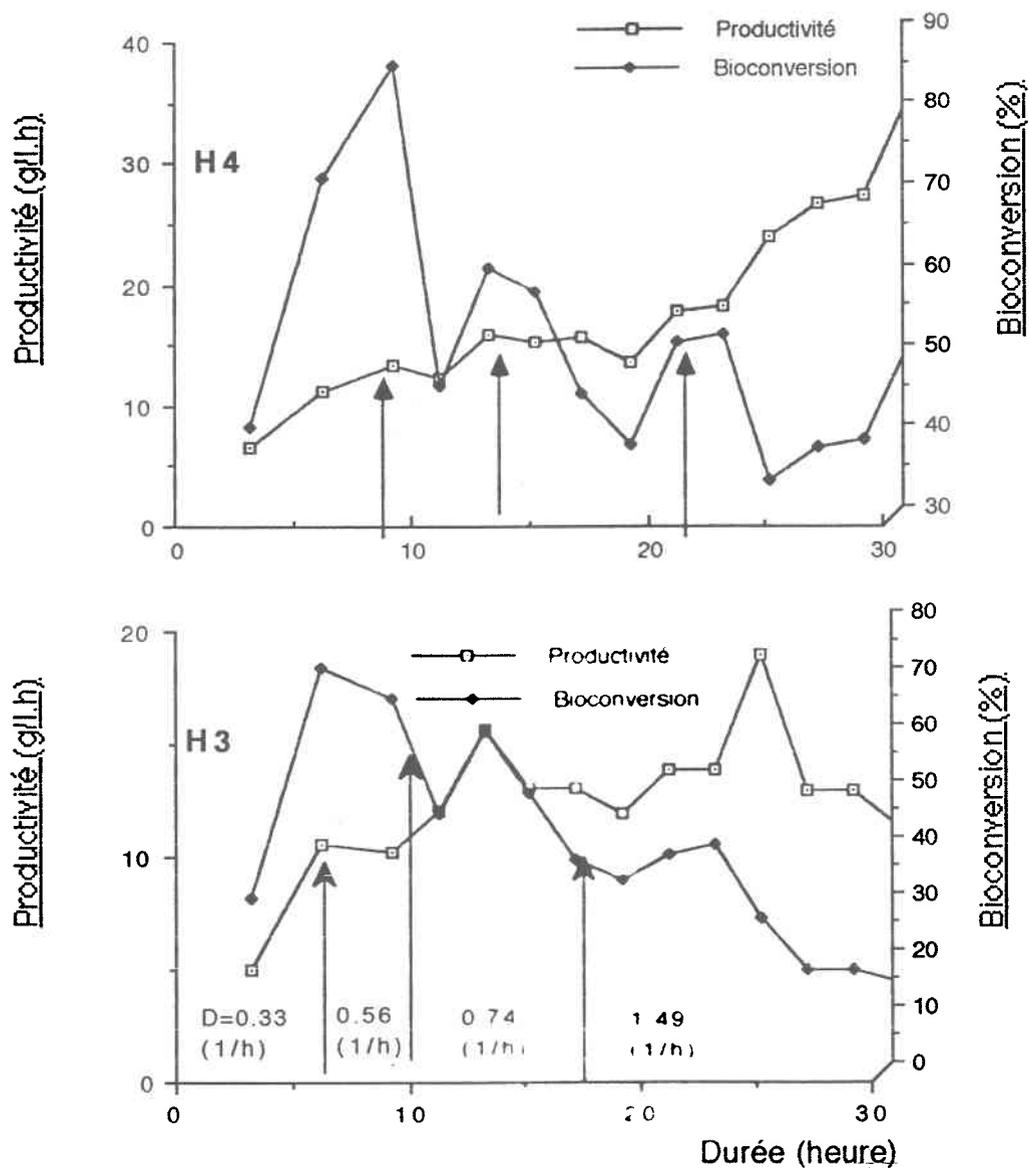


Figure 19: Profil de la productivité et du % de bioconversion à différents taux de dilution dans le temps, aux hauteurs H3 et H4 du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisé sur la bagasse et en présence de CaCO_3 .

L'opération du bioréacteur à $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$, pendant trois heures a généré la productivité la plus basse comparativement à celles obtenues aux autres taux de dilution utilisés précédemment (Figures 18 et 19). Le gradient de productivité dans le bioréacteur est alors de 1.3 à 6.2 g/L.h. Après 6 heures d'opération, la productivité a doublé pratiquement à toutes les hauteurs. La productivité augmente alors graduellement entre H1 et H4, et décrit un gradient de 4-12 g/L.h.

Le changement du taux de dilution de 0.33 à 0.56 h^{-1} n'a pas affecté la productivité au niveau de H1, alors qu'au niveau de H2, elle a légèrement baissé (Figure 18). Ce n'est qu'au niveau de H3 et H4 que la productivité a augmenté respectivement de 10 à 13 g/L.h et de 12 à 15 g/L.h (Figure 19). L'amélioration de la productivité au niveau de H3 et H4 a permis d'augmenter le gradient de la productivité de 4-12 g/L.h pour $D = 0.33 \text{ h}^{-1}$ à 4.7-15 g/L.h pour $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$.

La productivité a baissé au niveau de H1 et H2 lors du changement du taux de dilution de 0.56 à 0.74 h^{-1} (Figure 18). Elle est passée respectivement de 4.7 à 3.5 g/L.h et de 7 à 6 g/L.h. Au niveau de H3 et H4, elle a continué à augmenter passant respectivement de 12.7 à 13.7 g/L.h et de 15 à 17.5 g/L.h (Figure 19). La baisse de la productivité entre H1 et H2 lors de l'augmentation du taux de dilution, indique que la baisse de l'activité catabolique a un effet négatif plus important que l'effet positif de l'expansion partielle du lit fixe et de l'augmentation relative de la concentration du lactose disponible; alors qu'inversement, au niveau de H3 et H4 leurs impacts sont plus importants. Cette différence peut être attribuée à la plus grande quantité de cellules se trouvant entre H1 et H2 comparativement à H3 et H4. Des masses plus importantes de cellules peuvent gêner le transfert de masse et en particulier la diffusion du substrat, ce qui se traduit par une baisse de la productivité. Le gradient de productivité dans le bioréacteur a augmenté à $D = 0.74 \text{ h}^{-1}$ comparativement à celui généré à $D = 0.56 \text{ h}^{-1}$. Il est ainsi passé à 3.5-17.5 g/L.h comparativement à 4.7-15 g/L.h.

Au taux de dilution le plus élevé de 1.49 h^{-1} , la productivité a été améliorée à toutes les hauteurs du bioréacteur, et particulièrement au niveau de H4 (Figures 18 et 19). Le gradient du taux de dilution a augmenté de 4.7-15 g/L.h à 10-27 g/L.h entre H1 et H4. Le système a donc bien réagi à l'augmentation du taux de dilution (qui a doublé), en générant la productivité maximale. Il démontre aussi qu'il n'y a pas de lessivage cellulaire dans le bioréacteur à ce très haut taux de dilution.

Le rendement très élevé (0.98 g/g) de la bioconversion du lactose en lactate explique que le profil dynamique de la conversion du lactose en lactate suit exactement celui du lactate produit (Tableau 18).

La conversion maximale de 86% est atteinte au taux de dilution le plus bas de 0.33 h^{-1} (Figures 18 et 19). Le lactose converti augmente régulièrement entre H1 et H4 passant de 27% à 86%. Il indique que l'activité catabolique, et par conséquent les cellules immobilisées actives, est répartie uniformément dans le bioréacteur. Au taux de dilution de 0.56 h^{-1} , le pourcentage de conversion a baissé à toutes les hauteurs du bioréacteur, se stabilisant autour de 18-60% entre H1 et H4. La baisse a été plus marquée au niveau de H2, dûe probablement à une désorption des cellules actives à ce niveau sous l'action de forces de cisaillements plus élevées générées par un taux de dilution plus élevé. A $D = 0.74 \text{ h}^{-1}$, le pourcentage de conversion a aussi baissé à toutes les hauteurs du bioréacteur et se situe à 10-50% entre H1 et H4. Cette fois, c'est au niveau de H1 que l'impact du changement du taux de dilution est plus important.

La baisse de l'activité catabolique dans le bioréacteur en fonction du taux de dilution s'est d'abord manifestée aux niveaux les plus élevés (H4 et H3) pour ensuite se transférer aux niveaux les plus bas (H2 et H1). Le type d'écoulement ascendant du liquide dans le bioréacteur désorbe d'abord les cellules situées aux niveaux les plus élevés pour finalement affecter celles qui sont situées aux niveaux inférieurs par la mise en jeu de forces de cisaillements plus élevées (taux de dilution plus élevés). C'est la contribution supplémentaire de l'effet du compactage du support par gravité qui s'ajoute à l'immobilisation proprement dite qui aide à retenir plus efficacement les cellules aux niveaux les plus bas du bioréacteur.

Au taux de dilution le plus élevé de 1.49 h^{-1} , le pourcentage de conversion est de 13-40% entre H1 et H4. Il a baissé à tous les niveaux du bioréacteur, sauf à H1 où il a augmenté. Cette amélioration peut être due à une atténuation du compactage du support à ce niveau, impliquant un meilleur transfert de masse.

Le pourcentage de conversion du lactose en acide lactique a donc baissé avec l'augmentation du taux de dilution. Il a augmenté de façon régulière en fonction de la hauteur du bioréacteur entre H1 et H4.

3.3.3 Comparaison des performances des deux souches de lactobacilles immobilisées et opérées avec le contrôle de pH.

Les deux espèces *L. bulgaricus* Hansen 2217 et *L. helveticus* ATCC 10797 ont été opérées dans des conditions identiques. Dans un souci de simplicité, la comparaison se fera uniquement sur les performances maximales obtenues à la sortie du bioréacteur (soit au niveau de la hauteur H4).

Les deux espèces ont produit des concentrations maximales voisines d'acide lactique soit 38 et 39 g/L respectivement pour *L. helveticus* et *L. bulgaricus* (Tableau 8). La concentration de 39 g/L a été atteinte en phase de transition, car elle a ensuite baissé à 35 g/L dans la phase stable. Ces deux concentrations maximales ont été obtenues au même taux de dilution de $D=0.33 \text{ h}^{-1}$ pour les deux espèces (Tableau 8). C'est le taux de dilution le plus bas sous lequel a été opéré le bioréacteur de cellules immobilisées *L. helveticus*, ce qui n'est pas le cas de *L. bulgaricus*. Le taux de dilution le plus bas qui a été utilisé pour *L. bulgaricus* est $D=0.22 \text{ h}^{-1}$. La concentration maximale de lactate de 25 g/L produite alors, est inférieure à celle obtenue à $D=0.33 \text{ h}^{-1}$. Ce résultat inattendu, peut s'expliquer par le délai d'adaptation des cellules à leur environnement dans cette étape de démarrage du bioréacteur. L'amélioration des conditions rhéologiques dans le bioréacteur grâce à une certaine expansion du lit fixe de cellules immobilisées subséquente à l'accélération du débit du fluide pourrait aussi contribuer à l'amélioration des performances à $D=0.33 \text{ h}^{-1}$. Les deux espèces de lactobacilles immobilisées ont toutes les deux produit des concentrations très élevées de lactate et généré des performances équivalentes (tableau 8). Cependant le bioréacteur de cellules *L. bulgaricus* immobilisées semble légèrement moins stable que celui de *L. helveticus*. Cette instabilité ne s'est manifestée que dans les premières étapes d'opération du bioréacteur. Elle est illustrée par le délai d'adaptation des cellules et par la hausse de la concentration maximale de lactate après le changement du taux de dilution de 0.20 à 0.33 h^{-1} (Figures 12-13 et 16-17).

La productivité en acide lactique la plus élevée est de 26 g/L.h et elle est obtenue par le bioréacteur de cellules immobilisées de *L. helveticus* à $D= 1.49 \text{ h}^{-1}$ comparativement à 19 g/L.h obtenue par *L. bulgaricus* à $D= 1.12 \text{ h}^{-1}$ (Tableau 8). Une productivité maximale de 29 g/L.h est obtenue par *L. bulgaricus* durant l'étape de transition pour baisser ensuite à 19 g/L.h dans la phase stable. C'est un profil de comportement semblable à celui observé pour l'acide lactique produit (Figures 14-15 et 18-19).

La comparaison directe de ces performances n'établit pas adéquatement l'espèce qui a eu la meilleure productivité, puisque le taux de dilution n'est pas pris en considération. La productivité étant le produit du taux de dilution par la concentration de lactate, un taux de dilution plus élevé conduit à une productivité plus élevée. Le bioréacteur de *L. bulgaricus* n'ayant pas atteint le seuil critique de lessivage cellulaire à $D= 1.12 \text{ h}^{-1}$, une projection du taux de dilution à $D= 1.49 \text{ h}^{-1}$ peut être envisagé. La productivité recalculée pour $D= 1.49 \text{ h}^{-1}$ est alors de 25 g/L.h, ce qui montre que les performances sont pratiquement semblables pour les deux bioréacteurs en terme de productivité.

Le gradient de lactate le plus élevé a été obtenu au même taux de dilution de $D= 0.33 \text{ h}^{-1}$ pour les deux espèces de cellules immobilisées. C'est le système *L. helveticus* qui a généré le gradient le plus élevé de 12-38 g/L, comparativement à celui généré par *L. bulgaricus* de 17-35 g/L. Les quantités maximales de lactate produites par les deux bioréacteurs sont très voisines soit respectivement de 38 et 35 g/L pour *L. helveticus* et *L. bulgaricus*. La différence entre les deux gradients observés s'explique par la différence du profil cinétique de production du lactate dans les deux bioréacteurs. Pour le bioréacteur de *L. bulgaricus*, une plus grande quantité de lactate est produite au niveau de H1 comparativement à *L. helveticus*.

3.4 ÉVALUATION DE L'EFFET DU CONTRÔLE DE pH

Dans les bioréacteurs contenant les billes de CaCO_3 le pH est de 4.9, ce qui est moins acide que celui de 3.6 obtenu par les bioréacteurs sans contrôle de pH. Ce fait laisse prévoir une amélioration des performances grâce à l'élévation du pH. Les performances des bioréacteurs des deux espèces de lactobacilles immobilisées sur le support de bagasse, ont été en effet sensiblement améliorées par l'addition de carbonates de calcium. La concentration maximale de lactate produite est passée de 30 g/l à 35 et 38 g/l respectivement pour *L. bulgaricus* et *L. helveticus*, et la productivité a augmenté de 17 et 19 g/l.h à 19 et 26 g/l.h dans le même ordre (Tableau 9).

Tableau 9 : Performances recalculées pour les deux espèces de lactobacilles immobilisées, avec (B) et sans (A) contrôle de pH.

Paramètres		<i>L. helveticus</i> ATCC 10797	<i>L. bulgaricus</i> Hansen 2217
A	S_{sp} (g/l.g)	1.87	2.06
B	S_{sp} (g/l.g)	2.23	2.05
A	*Productivité(V_t) (g/l.h)	21.9	19.5
B	*Productivité(V_t) (g/l.h)	26	25.2
A	Productivité(V_r) (g/l.h)	35.7	34.4
B	Productivité(V_r) (g/l.h)	69.3	67.3
A	P_{sp} (h^{-1})	1.37	1.34
B	P_{sp} (h^{-1})	1.53	1.49

*Productivité recalculée pour un même taux de dilution $D = 1.49 h^{-1}$

L'évaluation de l'effet du contrôle de pH (par addition de CaCO_3) sur les performances des deux espèces de lactobacilles immobilisées, par comparaison directe des résultats avec et sans contrôle de pH est impossible. Certains paramètres (Tableaux 2 et 3) sont différents ce qui ne permet pas d'isoler l'effet du contrôle du pH.

La concentration de lactose utilisée pour alimenter le bioréacteur de *L. bulgaricus* immobilisé et opéré avec contrôle de pH, est plus élevée (45 g/l) que celle utilisée pour le bioréacteur sans contrôle de pH (37 g/l). La concentration du substrat ne semble pas avoir d'effet inhibiteur sur la conversion du lactose en lactate aussi bien pour l'espèce *L. helveticus* (Aeschlimann et Von stockar, 1989), que l'espèce *L. bulgaricus* (Mehaia et Cheryan, 1987). En considérant que le rendement et le pourcentage de la conversion du lactose ne dépendent pas de la concentration initiale du substrat, les performances devront probablement varier linéairement avec la concentration du lactose jusqu'à une certaine limite, à cause de l'inhibition due à l'acide lactique. La quantité de biomasse a un impact majeur sur les performances des bioréacteurs de cellules immobilisées. Il semble aussi y avoir une relation pratiquement linéaire entre la quantité de biomasse dans le bioréacteur et les performances générées (Mehaia et cheryan, 1986 ; 1987).

Au taux de dilution le plus bas (concentration maximale de lactate), la concentration spécifique maximale de lactate n'a augmenté sensiblement de 1.8 à 2.2 g/l.h que pour la souche immobilisée *L. helveticus* (Tableau 9) sous l'effet du contrôle du pH, alors qu'elle est demeurée constante à 2.1 g/l.h pour la souche immobilisée *L. bulgaricus* (Tableau 9). La souche *L. helveticus* semble donc plus sensible à l'effet combiné du pH et du lactate comparativement à la souche *L. bulgaricus* .

Au taux de dilution élevés, l'amélioration des performances a affecté aussi bien *L. helveticus* que *L. bulgaricus* . Cette amélioration est illustrée par l'augmentation de la productivité qui est passée de 21 à 26 g/l.h et de 19 à 25 g/l.h respectivement pour *L. helveticus* et *L. bulgaricus* sous l'effet du contrôle du pH. L'impact positif de cet effet est confirmé en comparant les performances sur la base de la productivité spécifique qui passe de 1.37 à 1.53 h^{-1} et de 1.34 à 1.49 h^{-1} respectivement pour *L. helveticus* et *L. bulgaricus* . L'impact est plus évident en comparant la productivité exprimée en fonction du volume réactionnel des bioréacteurs. En effet, la productivité

double pratiquement en passant de 35.7 à 69.3 g/l.h pour *L. helveticus* et de 34.4 à 67.3 g/l.h pour *L. bulgaricus* .

Il faut noter que l'addition des granules de carbonate de calcium dans les deux bioréacteurs de cellules immobilisées avec contrôle de pH, a réduit leur volume réactionnel de près du tiers. L'amélioration de la productivité volumétrique exprimée en fonction du volume total, malgré cette réduction, souligne l'importance de l'impact du pH sur le processus de conversion du perméat de lactosérum par les deux espèces de Lactobacilles immobilisées.

3.5 COMPARAISON AVEC LES RÉSULTATS PRÉSENTÉS DANS LA LITTÉRATURE

La productivité est considérée comme le paramètre le plus important pour évaluer les performances d'un bioréacteur (Atkinson, 1986 ; Tampion, 1987 ; Buchholz, 1982) . Dans notre expérience, les productivités les plus élevées (Tableau 10) ont été obtenues par les bioréacteurs de *L. bulgaricus* Hansen 2217 et *L. helveticus* ATCC 10797 avec contrôle de pH (lits de CaCO_3). Ceux sont ces performances qui sont retenues pour la comparaison avec les résultats des travaux similaires présentés dans la littérature (Tableaux 10-11). La grande variété des souches bactériennes utilisées pour la fermentation lactique du lactose, ainsi que celle des paramètres d'opération du procédé de fermentation, induit des différences importantes dans les performances, qui rendent la comparaison impossible, ou du moins sans grand intérêt. Pour palier à ces difficultés, le choix de la même espèce bactérienne et de conditions voisines pour la mise en oeuvre de la fermentation est pratiqué dans cette section comme base pour la comparaison des performances.

Pour *L. bulgaricus*, différents résultats concernant la fermentation en discontinu du lactose en lactate par des cellules libres sont rapportés dans la littérature (Tableau 10). La conversion d'environ 45 g/L de lactose, à une température de 45°C et un pH de 5.5, a été réalisée avec des productivités qui différaient en fonction de la souche de *L. bulgaricus* utilisée. Une souche indigène a généré une productivité de 1.4 g/L.h (Tewari, 1985) comparativement à des productivités de 3-4 g/L.h générés par la souche LKB (Reddy et al., 1976) et 4-5 g/L.h par la souche Hansen 2217 (Mehaia et Cheryan, 1987). Cette dernière présente une productivité qui est supérieure au double de celle obtenue par la souche indigène, ce qui met en évidence les différences physiologiques importantes qui peuvent exister à l'intérieur d'une même espèce de microorganisme. La différence, concernant les résultats observés pour les deux souches présentés par Reddy et al. (1976) et Mehaia et Cheryan (1987), découle essentiellement de la composition du milieu. Cette différence est subséquente au type de supplément proteique utilisé qui est de l'extrait de levure pour la productivité la plus élevée et de la liqueur de maïs pour la plus faible. Cet effet a été souligné par de nombreux auteurs (Chazeau et Larpent, 1980 ; Roy et al., 1986 ; Aeschlimann et Von Stockar, 1989).

Tableau 10: Performances maximales de la fermentation du latose par différentes souches de *L.bulgaricus* selon différents procédés.

<u>Si</u> (g/L)	<u>P</u> (g/L)	<u>Conversion</u> (%)	<u>Productivité</u> (g/L.h)	<u>Référence</u>
Procédé Discontinu				
30-70	75	99-95	3-4.3	Reddy, 1977
47-85	45-85	99	4.1-5.1	Mehaia, 1987
45	32.8	75	1.4	Tewari, 1985
Procédé Continu				
45	33	73	1.1	Cox, 1977
50	43	86	2.9	Keller, 1975
Procédé Cellules Immobilisées				
45	35	78	19.0	Ce Travail

Mehaia et Cheryan (1987) ont utilisé la même souche de *L. bulgaricus* que cette recherche, et des conditions similaires d'opération (concentration initiale de substrat, type et concentration du supplément proteique), ce qui constitue une base homogène pour la comparaison des performances. La productivité maximale de 19 g/L.h (Tableau 10) a été obtenue par notre bioréacteur de cellules *L. bulgaricus* Hansen 2217 immobilisées et opéré en continu avec contrôle de pH à $D = 1.12 \text{ h}^{-1}$. Elle est 4 fois plus élevée que celle présentée par le système de fermentation discontinue. Ce résultat démontre que notre système de cellules immobilisées opérées en continu représente une amélioration remarquable comparativement au procédé discontinu. Cette amélioration est d'autant plus importante que l'on n'a pas considéré les délais générés par l'arrêt de la fermentation, la stérilisation, le remplissage du réacteur et le démarrage de la fermentation inhérents au procédé discontinu.

Le procédé de fermentation en continu permet d'éliminer ces inconvénients liés à l'utilisation de procédés discontinus. Des travaux concernant la fermentation en continu du lactose par *L. bulgaricus* Hansen 2217 ont été présentés par Keller et Gerhardt (1975). Une productivité de près de 3 g/L.h a été obtenue, lors de la bioconversion en continu du lactose en lactate à $D=0.06 \text{ h}^{-1}$, à pH 5.5 et à la température de 44°C. Ce procédé continu ne présente aucune amélioration, en terme de performances, comparativement au procédé discontinu, ce qui peut être dû à l'absence de supplémentation proteique du milieu de fermentation. En effet, Cox et McBean (1977) réussissent à augmenter la productivité par un facteur de trois pour la même souche. La productivité est passée de 3.6 à près de 11 g/L.h en augmentant la quantité d'extrait de levure de 0.4 à 1.2% (p/v). Cette performance reste cependant deux fois plus faible que celle obtenue par notre système. Le procédé -d'immobilisation des cellules permet d'augmenter la concentration de la biomasse dans le réacteur qui atteint près de 60 g/L pour notre bioréacteur ce qui peut expliquer en partie la supériorité des performances du procédé de cellules immobilisées comparativement au procédé continu de cellules libres. L'augmentation de la concentration de la biomasse de 10 à 60 g/L a permis d'augmenter la productivité de 13 à 80 g/L.h dans un bioréacteur à membrane avec recyclage des cellules (Mehaia et Cheryan, 1987). La relation entre la productivité et la concentration de la biomasse dans le

bioréacteur est pratiquement linéaire. La productivité spécifique estimée pour notre bioréacteur est de 1.33 h^{-1} , alors qu'elle est de 1.3 h^{-1} pour le bioréacteur à membrane avec recyclage des cellules. Ce résultat indique des performances pratiquement identiques des deux bioréacteurs lorsqu'on tient compte de la quantité de biomasse utilisée. La comparaison de la productivité sur une base de la même concentration de biomasse est plausible puisqu'il est possible d'augmenter dans notre système la quantité de cellules immobilisées.

Les performances particulièrement élevées, avec la production de concentrations de lactate de 110 g/L , obtenues par ce bioréacteur à membrane avec recyclage cellulaire, dépassent de loin celles reportées dans la littérature. Elles sont jusqu'à 17 fois plus élevées que celles obtenues par le procédé discontinu, et 4 fois plus élevées que celles obtenues par notre système. La productivité de ce bioréacteur est de 84 g/L.h . Elle est aussi 4 fois plus élevée que celle obtenue par notre système et à un taux de dilution plus bas ($D = 0.72 \text{ h}^{-1}$). Le maintien efficace d'un pH uniforme de 5.6, ainsi qu'un meilleur contact des cellules avec le substrat réalisé grâce à l'agitation du milieu de fermentation, explique partiellement l'excellence de ces résultats. Ces performances sont en fait directement liées à la fois à la concentration initiale très élevée du lactose qui est de 134 g/L , et aux très hautes concentrations de la biomasse maintenues dans le bioréacteur, pouvant atteindre 65 g/L . En normalisant pour la concentration du lactose, la concentration de la biomasse et le taux de dilution, la productivité recalculée pour notre bioréacteur serait de 135 g/L.h , et dépasserait celle obtenue par le bioréacteur à membrane avec recyclage cellulaire qui est de 85 g/L.h .

Des concentrations de biomasse de 60 g/L , laissent entrevoir des coûts énergétiques élevés reliés au pompage, dû à une viscosité plus élevée du milieu de fermentation. Le colmatage (Stieber et Coulman, 1977) est un autre inconvénient inhérent à l'utilisation de bioréacteur à membrane avec recyclage cellulaire. Un arrêt d'opération du bioréacteur est alors nécessaire pour restaurer la membrane afin de pouvoir ensuite le redémarrer. Ces manipulations engendrent des pertes en termes de temps et d'énergie ce qui se traduit par des répercussions négatives sur la productivité réelle du bioréacteur, et génère des coûts supplémentaires "invisibles".

Tableau 11: Performances maximales de la fermentation du lactose par différentes souches de *L.helveticus* selon différents procédés.

Si	P	Conversion	Productivité	Référence
(g/L)	(g/L)	(%)	(g/L.h)	
Procédé Discontinu				
48	42	88	3.8	Aeschlimann, 1989
37.2	35	93	2.7	Roy, 1986
Procédé Continu				
40	33	81	4.7	Aechlimann, 1989
46	43	93	8.2	Aechlimann, 1990
37.6	32.9	87.5	9.7	Roy, 1987
Procédé Cellules Immobilisées				
38	31	82	2.6	Roy, 1987
45	38	84	26.0	Ce travail

Le bioréacteur de cellules immobilisées *L. helveticus* garni de granules de CaCO_3 et opéré en continu, a généré une productivité maximale de 26 g/L.h à $D=1.49 \text{ h}^{-1}$ (tableau 11). Cette performance est 9 fois plus élevée que celle obtenue par la fermentation en batch avec la souche *L. helveticus* Milano (Roy et al., 1987), et près de 6 fois celle avec la souche *L. helveticus* STP (Aeschlimann et Von Stockar, 1989), qui présentent respectivement des productivités de 2.7 et 3.7 g/L.h. La différence de productivité entre ces deux souches s'explique d'une part par la concentration plus faible de lactose utilisée soit 37 g/L (Roy et al., 1987) versus 46 g/L (Aeschlimann et Von Stockar, 1989), d'autre part la conversion moins poussée de lactose 88% versus 93%, autrement leurs performances sont équivalentes.

Ces explications sont confortées par les valeurs voisines de la productivité maximale par les deux souches opérées en procédé continu. Roy et al (1987) rapportent une productivité de 9.7 g/L.h à $D=0.48 \text{ h}^{-1}$, alors que Aeschlimann et Von stockar (1989) rapportent une productivité de 8.3 g/L.h à $D=0.4 \text{ h}^{-1}$. La productivité plus élevée rapportée par Roy est conséquente à une supplémentation plus poussée en extrait de levures soit 15 g/L comparativement à 10 g/L. Considérant que 1 g/L supplémentaire d'extrait de levures augmente de 0.16 g/L.h la productivité à $D=0.22 \text{ h}^{-1}$ (Aeschlimann et Von Stockar, 1990), la productivité recalculée serait de 9.1 g/L.h, par conséquent les performances en terme de productivité seraient identiques.

Notre procédé de cellules immobilisées est trois fois plus performant que le procédé continu de cellules libres avec une productivité de 26 g/L.h comparativement à 9.3 g/L.h. La différence des performances entre les deux procédés s'explique par la contrainte de lessivage cellulaire inhérente au procédé de cellules libres. Le taux de dilution maximal qui peut être utilisé dans ce cas ne peut dépasser le taux spécifique maximal de la croissance cellulaire qui est de 0.7 h^{-1} pour *L. helveticus*.

Les rares travaux impliquant l'utilisation de *L. helveticus* dans des bioréacteurs de cellules immobilisées pour la bioconversion de lactose sont présentés par Roy et al (1986 1987 et 1988). Les cellules ont été immobilisées dans des billes d'alginate et disposées en lit fixe dans une colonne à trois étages. Ce bioréacteur a été opéré en mode continu à une température constante de 42°C

et un pH de 5.9. Une productivité maximale de 2.6 g/L.h à $D= 0.15 \text{ h}^{-1}$ a été obtenue lors de la fermentation de perméat de lactosérum supplémenté avec 15 g/L d'extrait de levures. Cette productivité est 10 fois plus basse que celle obtenue par notre bioréacteur de *L. helveticus* immobilisées. Cette très faible performance est dûe à la pauvreté du transfert de masse au niveau des billes d'alginate, à laquelle s'ajoute l'effet négatif de la dissolution du support sous l'action de l'acide lactique. Cette dissolution conduit au compactage du support et se traduit par un blocage dans le bioréacteur au cours du temps.

La bagasse, comparativement aux billes d'alginate, présente une structure et des caractéristiques qui préviennent ces deux types de problèmes. La dimension des pores (cavités) et l'architecture arachnéenne de la bagasse (Voir section 3.1) ne présentent aucune barrière au transfert de masse du substrat et du produit dans le système Liquide de fermentation-Support. La composition chimique de la bagasse (cellulose et lignine), ainsi que ses caractéristiques physiques (mouillabilité, faible densité) expliquent sa grande résistance à l'acide lactique en milieu liquide. D'ailleurs, un des procédés les plus utilisés à l'échelle industrielle pour conserver la bagasse est le procédé Ritter, qui consiste justement à l'immerger dans un milieu liquide préalablement acidifié à l'acide lactique.

IV) CONCLUSION

La méthode d'immobilisation des lactobacilles sur le support de bagasse est simple, rapide, efficace, très performante et peu coûteuse. Il n'y a aucun effet négatif sur la physiologie des cellules (rendement de bioconversion très élevé). Ces résultats démontrent les grandes qualités de la bagasse comme support solide pour l'immobilisation des microorganismes, et particulièrement pour les lactobacilles.

La réalisation de bioréacteurs garnis avec les cellules immobilisées et leur opération en mode piston ascendant, avec un contrôle de la température et sans contrôle de pH, est très simple, rapide et ne demande pas de conditions drastiques pour éviter les contaminations indésirables. Les performances (essentiellement en terme de productivité) de ces bioréacteurs pour la fermentation lactique du perméat de lactosérum dépasse très largement les résultats présentés dans la littérature, exception faite pour les performances des bioréacteurs à membranes avec recyclage cellulaire. Des taux de dilution très élevés ont pu être pratiqués sans qu'il y ait de lessivage cellulaire. Ces résultats permettent d'envisager son utilisation potentielle à l'échelle industrielle et particulièrement pour les petites industries qui ont motivé cette recherche.

La mise en place dans le bioréacteur de couches de granules de CaCO_3 alternant avec les lits de cellules immobilisées a permis de contrôler le pH de façon élégante, simple et assez efficace. Les performances des bioréacteurs avec contrôle de pH ont été sensiblement améliorées comparativement à celles des bioréacteurs sans contrôle de pH. La concentration d'acide lactique produit ainsi que la productivité ont été augmentées de 30% approximativement. Cependant, si le pH dans le bioréacteur était moins acide, ces performances pourraient être probablement doublées. L'amélioration des performances avec le contrôle de pH, a été plus importante pour *L.helveticus* ATCC 10797 que la souche *L.bulgaricus* Hansen 2217, ce qui montre qu'elle est plus sensible au pH acide .

Les deux espèces de lactobacilles ont présenté des performances très élevées et équivalentes, ce qui permet d'envisager d'interchanger ces deux souches afin d'éviter ou de résoudre les problèmes d'attaque phagique.

Les bioréacteurs de lactobacilles immobilisés sur le support de bagasse, développés dans le cadre de cette recherche, ont présenté une productivité en acide lactique plus élevée que la plupart de celle de travaux similaires rapportés dans la littérature. La technique simple, rapide et efficace d'immobilisation des lactobacilles sur le support solide, la simplicité d'opération des bioréacteurs et leur performances très élevées, laissent envisager leur utilisation potentielle dans les petites industries laitières. Le contrôle de pH par addition de granules de CaCO_3 dans le lit fixe de cellules immobilisées, constitue une méthode très simple et efficace pour contrôler le pH dans le bioréacteur lors de sa mise en oeuvre en continu.

L'ensemble des objectifs globaux et spécifiques de cette recherche ont été largement rencontrés. Ces résultats positifs encouragent la poursuite de ces travaux pour parfaire la connaissance et l'amélioration de ces systèmes de lactobacilles immobilisés sur le support de bagasse.

V) Suggestions pour des travaux à venir

De nombreuses voies de recherche peuvent être suivies pour apporter des améliorations et des réponses sur les plans académiques et pratiques en ce qui concerne l'immobilisation cellulaire par adsorption. Des travaux pour établir la corrélation entre l'adsorption des cellules au support et les énergies de surface ou le potentiel zéta des cellules et du support permettrait de rationaliser cette technique et de mieux contrôler sa réalisation. Du point de vue pratique, réaliser l'activation chimique des groupements fonctionnels de la bagasse permettrait probablement d'augmenter la quantité de biomasse immobilisée sur le support et par conséquent améliorerait les performances de la bioconversion. Finalement, un nombre de replicats plus adéquat concernant les expériences de l'optimisation des paramètres permettrait de dissocier distinctement les effets induits à chaque paramètre, ce qui apporterait des solutions pragmatiques, en permettant de prioriser les choix de paramètres à optimiser.

Le contrôle de pH dans les bioréacteurs est important pour améliorer les performances de la bioconversion du lactose en lactate. L'utilisation de couches de CaCO_3 pour contrôler le pH dans le cadre de nos travaux est très intéressante, mais on pourrait y adjoindre d'autres interventions telle l'addition préalable de tampon dans le milieu de fermentation, ou augmenter la surface spécifique des granules de CaCO_3 , pour améliorer encore plus les performances.

La quantification de la biomasse, ainsi que la détermination de sa distribution entre l'état libre et immobilisé n'a pas pu être déterminée dans le cadre de cette expérience. Malgré que cette détermination soit reconnue comme très difficile par de nombreux chercheurs, il faudrait chercher à trouver des solutions pour la réaliser.

Des expériences à long terme (six mois et plus), doivent être réalisées pour tester la durée de vie du bioréacteur, ce qui constitue un paramètre déterminant pour le choix d'un procédé pour la fermentation en continu à l'échelle industrielle. Dans cette expérience tous les bioréacteurs ont été opérés pour des périodes de 4 à 6 semaines sans qu'il y ait de problèmes, et tout en maintenant les mêmes performances.

L'automatisation du dosage des différents paramètres de fermentation devient incontournable aussi bien sur le plan de la quantification que celui de la qualité intrinsèque des mesures. La quantité et l'éventail des paramètres à doser dicte en effet cette voie, en particulier parce qu'il est inévitable d'aborder la modélisation du procédé pour songer à son application à l'échelle pilote et industrielle. Il faut donc développer des procédures automatiques simples et s'orienter vers la modélisation.

VI) BIBLIOGRAPHIE

Abbot, B.J et Gerhardt, P. (1970). Dialysis fermentation. *Biotech. Bioeng.* Vol **12**, p 577-589.

Addesso, K.M (1986). Permeate fermentation. *J Food Science*, Vol **51**(6), p 1467-1473.

Accolas, J.P (1982). Taxonomic features and identification of *L.bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Bulletin of International Dairy Federation (IDF)*, Vol **132**, p 3-10.

Accolas, J.P. ; Hemme, D. ; Desmazeaud, M.S. ; Vassal, D. ; Bouillane, C. et Veaux, M. (1980). Les levains lactiques thermophiles: Propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait* , Vol **60**, p 487-524.

Adams, C et Eckenfelder, W.W. (1970). Response of activated sludge to organic transient loadings. *J. Sanitary Eng. Division*, Vol **25**, p 333-352.

Aeschlimann, A. et Von Stockar, U. (1989). The production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology letters*, Vol **11** (3) p 195-200.

Aeschlimann, A. ; Stasi, L. et Von Stockar, U. (1990). Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* in two chemostats in series. *Enz. Microbiol.. Technol.* Vol **12**, p 926-932.

Agbebavi, J.T ; Rouleau, D. et Mayer, R.C. (1987). The effects of whey cations on the kinetic parameters of a model for the enzymic hydrolysis of lactose. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, Vol **37**, (3), p 153-168.

Alais, C. (1984) . *Science du lait*. 4 Edition. Edition SEPAIC, Paris, France.

Amouzou, K.S. ; Prevost, H. et Divies, C. (1985) Influence de la supplémentation du lait en magnésium sur la fermentation lactique réalisée par *L.lactis* et *S. thermophilus*. *Lait* Vol **65**, (1) p 21-34.

Anonyme (1983) . "Genetics of industrial microorganisms." In : *Methods in industrial microbiology*. Sikyta, B. (Ed) . John Wiley & Sons, N.Y, p 214-243.

Archibald, F.S. (1986). Manganese : its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *CRC crit. Rev Microbiol.* Vol **13** (1), p 63-109.

Arnott, D.R. ; Patton, S. et Kesler, E.M. (1958). A method for manufacturing a high-nitrogen low -lactose product from whey. *J. Dairy Sci.* Vol **41**, p 931-941.

Atkinson, B. (1986). "Immobilized cells, their applications and potentiel." In: *Process engineering aspects of immobilised cell systems.* Webb, C ; Black, G.M. et Atkinson, B. (Eds). Institution of chemical engineers, Rugby Warwickshire , p 3-19.

Atkinson, B. ; Black, G.M. et Pinches, A. (1980). Process intensification using cells support systems . *Process Biochem.* Vol **15**, p 24-32.

Audet, P. ; Paquin, C. et Lacroix, C. (1989). Sugar utilization and acid production of free and entrapped cells of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a whey permeate medium. *Appli. Environ. Microbiol.* Vol **55** (1), p 185-189.

Audet, P. ; Paquin, C. et Lacroix, C. (1988). Immobilized growing lactic acid bacteria with K-carrageenan locust bean gum gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol **29**, p11-18.

Bechtel, R.M. et Claydon, T.J. (1971). Accelerated fermentation of cheese whey . Developing the system . *J. Dairy Sci.* Vol **54**, p 1959-1604.

Bergère, J.L (1968) . Production massive de cellules de Streptocoques lactiques. *Le Lait*, Vol **48**, p 131-139.

Bernstein, D. et Everson.T.C. (1973). Protein production from acid whey via fermentation . In " Food processing waste management" . Cornell. N.Y

Bigret, M (1985). Le lactobacille -Aujourd'hui . *Biofutur* Nov. 1985 . p 35-37

Birnbaum, S. ; Larsson, P.O. et Mosbach, K. (1986). Immobilised biocatalysts, the choice between enzymes and cells . In " Process engineering aspects of immobilised cell systems. Webb, C ; Black, G M et

- Atkinson, B. (Eds). Institution of chemical engineers, Rugby Warwickshire, p 35-59.
- Bitton, G. et Marshall, K.C. (1980). Adsorption of microorganisms to surfaces . Willey and Sons . N.Y., p143-150.
- Boyaval, P. (1989). Lactic acid bacteria and metal ions . Le Lait , Vol **69** (2), p 87-113.
- Boyaval, P. ; Lebrun, A. et Goulet, J. (1985). Etude de l'immobilisation de *Lactobacillus helveticus* dans des billes d'alginate de calcium . Le Lait , Vol **65**, p 185-199.
- Bringi, V. et Dale, B.E. (1985). Enhanced yeast immobilization by nutriment starvation . Biotechnol. Letters, Vol **7**, p 905-908.
- Brodelius, P. et Vandamme, E.J., (1987). "Immobilized cells systems." In: Biotechnology. Kennedy, J.F (Ed), Verlag Chemie, Weinheim, Florida and Basel. Vol **7a**, p 407-463.
- Buchholz, K. (1982). Reaction engineering parameters for immobilized biocatalysts. In Advance Biochemical Engineering, Vol **24**, Fletcher (Ed) Springer-Verlag, p 39-72.
- Burton, L.V (1937) . Byproducts of milk. Food Ind. Vol **9**, p 571-575, 617-618 et 634-636.
- Campbell, H.A. (1953). Production of calcium lactate and lactic acid from cheese whey. The canadian dairy and ice cream journal. Mars p 29-31, p 77-78.
- Champagne, C.P.; Baillargeon-Côté, C. et Goulet, J. (1988). Fermentation du lactosérum par cellules immobilisées de *Lactobacillus helveticus*. Can. Inst. Food Sci. Technol., Vol **21** (4), p 403-407.
- Champagne, C.P. et Boyaval, P. (1988). Les cellules immobilisées te l'industrie laitière. Technique Laitière Vol 1015, p 26-31.
- Champagne, C.P. ; Côté, C. et Goulet, J. (1988). Fermentation du lactosérum par des cellules immobilisées de *Lactobacillus helveticus*. Can. Inst. Sci. Technol., Vol **21**(4), p 403-407.

Champagne, C.P. et Côté, C. (1987). Cream fermentation by lactic acid bacteria. *Biotechnology letters* Vol **9**, p 329.

Chazaud, M.T. et Larpent, M.J.P. (1980). Stimulation de l'activité des ferments lactiques par l'extrait de levure. *Revue laitière française*, Vol **383**, p 19-24.

Cheryan, M. et Mehaia, M.A. (1984). Ethanol production in a membrane recycle bioreactor conversion of glucose using *Saccharomyces Cerevisiae*. *Process Biochem.*, Vol **19** (6), p 204-208.

Chang, H.N. et Park, T.H. (1985) Immobilised cells. *Theor. Biol.*, Vol **116**, p 9-12 .

Cheung, I.H.S ; Gishen, M. ; Ghosh, P. et Pamment, N.B. (1986). Continuous ethanol production in a immobilized whole cell fermenter using untreated sugar cane bagasse as carrier. *J. Appli. Microbiol. Biotech.*, Vol **223**, p 413-416.

Chibata, I. ; Tosa, T. et Sato, S. (1983). Immobilized cells to prepare fine chemicals. *Adv. Biotechnol. Process* Vol **1**, Alan R. Liss Inc (Eds), N.Y., p 204-219.

Cogan, T.M. (1984). Cultures lactiques mésophiles. *International Dairy Federation*, Vol **179**, p 72-83.

Cogan, T.M. (1980). Les levains lactiques mésophiles. Une revue. *Le Lait*, Vol **60**, p 397-425.

Compere, A.L. et Griffith, W.L. (1975). Developments in industrial Microbiology, vol **17**, p 247-252 .

Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbial. Reviews*, Vol **46**, p 369-280.

Coton, G. (1988). Trends in utilization of whey and whey derivatives. *Bulletin of International Dairy Federation #233*, p3.

Coulman, G.A. ; Stieber, R.W. et Gerhardt, P. (1977). Dialysis continuous process for ammonium-lactate fermentation of whey: mathematical model and computer simulation. *Appl. Envir. Microbiol.*, Vol **34** p 733.

Cox, G.C. et Macbean, R.D. (1977). Lactic production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate . *Australian Journal of Dairy Technology* Mars p 19-22 .

Daniels, S.L (1972). The adsorption of microorganisms onto solid surfaces. *Develop. Ind Microbiol.* Vol **13**, p 211-253.

Dellaglio, F. (1988). Starter for fermented milks. *Bulletin of International Dairy Federation (IDF)*, Vol **227**, p 7-19.

Dellaglio, F. (1984). Les bactéries lactiques thermophiles . *Bulletin of International Dairy Federation (IDF)*, Vol **179**, p 65-71.

Demott, B.J. (1982). Ethanol from cottage cheese whey and candy plant wastes . *Cultured dairy Products Journal* (nov 1982) p 17-22.

Desmazeaud, M. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques . *Le Lait*, Vol **63** (2), p 267-316.

Divies, C. (1977) . Application du marquage par la 3H6 Thimidine à l'étude de la multiplication de *L. casei* emprisonnée dans un gel polyacrylamide. *Ann. Microbiol.* Vol **128**, p349-358.

Dombuti, G.A. et Steinberg, D.H. (1979). Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose , glucose and galactose. *J. Food Protection Appli. Environ Microbiol.* Vol **42** (11), p 885-887.

Dubois, M Gilles, J.K. ; Hamilton, P.A. et Smith, F. (1956). Colorometric method for the determination of sugars and related substances. *Analytica chemistry* Vol **28** (3). p 350-356.

Dupuis, R. (1990) Communication personnelle. Conseil industriel, ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec. 200-A, chemin Sainte Foy Québec G1R 4X6.

Durand, G. et Navarro, J.M (1978). Immobilized microbial cells. Proc. Biochem. Sept. P 14-23.

Dykhuisen, D.E. et Hartl, D.L. (1983). Selection in chemostats. Microbial Rev., Vol 47, p 150-153.

Engasser, J.M. (1988). " Réacteurs à enzymes et cellule immobilisées " Dans : Biotechnologie. Scriban, R. (Ed), Lavoisier TEC DOC, Paris, p 469-486.

Eisenberg, D. ; Crothers, D. (1979). Hydrophobic bonding results from minimization of the free energy . In " Physical chemistry with applications to the life science. The Benjamin Cumming Publishing company, London, Amsterdam, Ontario et Sydney, p 164-168.

Ellwood, D.C. ; Kevil, C.W. ; Marsh, P.D. ; Brown, C.M. et Wardell, J.N. (1982). Surface associated growth . Philosophical Transactions of the royal Society, London ,Series B. , 297 p517-532.

Ennis, B.M. et Maddox, I.S. (1985). Use of *Clostridium acetobutylicum* P262 for production of solvents from whey permeate . Biotechnology Letters, Vol 7 (8), p 601-603.

Everson, T.C. (1991). Controle of phage in the dairy plant. Bulletin of International Dairy Federation (IDF), Vol 263, p 24-28.

F.A.O (Food and Agricultural Organisation) (1990). Quaterly bulletin of statistics, Vol 3 , tables 30 et 53.

Fletcher, M. (1990) Surfaces and bacteria in natural environnement s - Nature's banquet table? . In "Physiology of immobilized cells . Elsevier Science Pub. Amsterdam, p 25-35 .

Fletcher, M. (1985). Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria . In : Bacterial adhesion. Savage, D.C. et Fletcher, M. (Eds) . Plenum, Press , New York, p 339-362.

Friedman, M.R. et Gaden E.L. (1970). Growth and acid production by *Lactobacillus (L.) delbrueckii* in a dialysis culture system. Biotechnol. Bioeng., Vol XII, p 961-974.

Fukui, S. et Tanaka, A. (1982). Immobilized microbial cells. *Ann. Rev. Microbiol.*, Vol **36**, p 145-172.

Gallup, D.M. et Gerhardt, P. (1963) Dialysis fermentor system for concentrated culture of microorganisms. *Appl. Microbiol.*, Vol **11**, p 506-512.

Gerhardt, P.Gallup, D.M. (1963) Dialysis flask for concentrated culture of microorganisms. *J. Bact.*, Vol **86**, p 919-929.

Gerson, D.F. et Jasic, J.E. (1979) The biophysics of cellular adhesion. In "Immobilized microbial cells. *Am. Chem. Symp. Ser.*, **106**., p 29-57.

Gilliand, S.E. et Speck, M.L. (1977). Use of miniteck system for characterizing Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol **33** (6), p 1289-1292.

Glass, L. et Hedrick, T.I (1977). Nutritional composition of sweet and acid-type wheys. *Journal of Dairy Science*, Vol **60**, p 190-196.

Goursaud, J. (1986) Biotransformation du lactose. *Industrie Agriculture Aliment.*, Mai 1986. p 349.

Guidini, M. ; Papillon, D. ; Raphalen, D. et Bariore, B. (1984). Contribution à la valorisation du lactosérum. I : Utilisations actuelles et potentielles. *Bul. Soc. Sci. Bretagne*. Vol **56**. p 77-88.

Hammer, G. (1990) Immobilized microbes : Interfaces gradients and physiology. In "Physiology of immobilized cells. Elsevier Science Pub., Amsterdam. p 15 - 24.

Harder, W. et Kuenen, J. (1977). Microbial selection in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* Vol **43**. p 1-7.

Hargrove, R.E. McDonough; Lacroix, D.E. et Arford, J.A (1976). Production and properties of deproteinized whey powders. *Journal of Dairy Science*, Vol **59** (1) p 25

Hemme, D.H. Schmal, V. et Auclair, J.E. (1981). Effect of the addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. *J. Dairy Res.*, Vol **48**, p 139-148.

Hickey, M.W. ; Hillier, A.J. et Jago, R. (1986). Transport and metabolism of lactose , Glucose and Galactose in homofermentative Lactobacilli . Appli. Environ. Microbiol., Vol **51** (1), p 825-831 .

Ho, C.S. (1986). An understanding of the forces in the adhesion of microorganisms to surfaces . Process Biochem., Vol **21**, p 148-152.

Hollo, J. ; Toth, J. ; Tengerdy, R.P. et Johnson, J.E. (1979). Denitrification and removal of heavy metals from wastewater by immobilized microorganisms . In "Immobilized microbial cells. Am. Chem. Symp. Ser. **106**, p 29-57.

Hongo, M. ; Nomusa, Y et Jwahara, M. (1986). Novel method of lactic acid production by electrodialysis fermentation . Appl. Environ. Microbiol., Vol **52** (2), p 314-319.

Jabubowska, J. ; Aberman, H. ; Libudzisz, Z et Metodiewa, D (1972). Continuous cultivation of lactic acid bacteria grown in simple and mixed populations . Proc. IV IFS : Ferment. Technol. Today, Tokyo, p135-141.

Jelen, P. (1979). Industrial whey processing technology : An overview. J. Agric. Food Chem., Vol **27** (4), p 658-661.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria . J. Antonie Van Leeuwenhoek, Vol **49**, p 209-224.

Kaneuchi, C. ; Sebi, M. et Komogsta, K. (1988). Production of succinic acid from citric acid and related by lactobacillus strains. Appl. Environ. Microbiol. Vol **54** (12), p 3053-3056.

Karel, S.F.; Libicki, S.B. et Robertson, C.R. (1985). Adsorption. Chem. Eng. Science, Vol **40**, p 1321.

Keller, A.K. et Gerhardt, P. (1975). Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein. Biotechnol. Bioeng., Vol **XVII**, p 997-1018.

Kennedy, J.F. et Cabral, M.S. (1987). Enzymes immobilization. In " Biotechnology". Rehm, H.J. et Reed, G. (Ed) . Vol 7a, V.C.H, Germany.

Kennedy, J.F. et Cabral, M.S. (1985). In "Immobilized enzymes and cells. J Woodwards (Ed) p19-37. IRL Press Oxford, U.K.

Kennedy, J.F. et Cabral, M.S. (1983). In "Immobilized cells and their application" . p190-280 .IRL Press Oxford, U.K.

King, U.A.E. et Zall, R.R. (1983). Ethanol fermentation using calcium alginate entrapped yeasts. *Process Biochem.*, Vol **18** (5), p 17-20.

Knopp, T.K. (1988). Whey utilisation in cheese. *Cultured Dairy products journal*. Mai 1988.

Koga, S. et Humphrey, A.E. (1967). Study of dynamic behavior of the chemostat system. *Biotech. Bioeng.*, Vol **IX** , p 375-386.

Kolot, F.B. (1981). Microbial carriers - Strategy for selection. *Process Biochem.*, Vol **16** (5), p 2-9.

Kolot, F.B. (1981). Microbial carriers - Strategy for selection - Part 2 . *Process Biochem.*, Vol **16** (6), p 30-46.

Konings, W.N. et Otto, R. (1983). Energy transduction and solute transport in Streptococci . *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Seriol.*, Vol **49**, p 247-257.

Kosikowski, F.V. (1977) . Cheese and fermented milk foods Edwards Brothers Inc. Ann Arbor. Mich. p 450.

Krekeler, C. ; Klein, J. et Ziehr, H. (1990). Parameters determining the adsorption of microorganisms to inert supports. In "Physiology of immobilized cells. Elsevier Science Pub., Amsterdam, p 445-449.

Lacey, J. (1980). The microbiology of sugar cane bagasse . Proc. 17 Th Congress ISSCT, Cairo.

Law, B.A. (1984) . Flavours development in cheese. In " Advances in Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk. Davies F.L. et Law B.A. (ed), p 187-228. Elsevier Applied science Publishers, London.

Lawrence, A.J. (1975). Determination of lactic acid in cream. *Australien J. Dairy Technology* . Vol **30** (1), p 14-15.

Lawrence, R.C. et Thomas, T.S. (1976). Reviews of the progress of dairy sciences: cheese starters . J. Dairy Sc., Vol **43**, p 141-193.

Ledesma, O.V. ; De Ruiz Holgado, A.P. ; Olivier, G. ; De Giori, G.S. ; Raibaud, P. ; Galpin, J.V. (1977). A synthetic medium for comparative nutritional studies of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol., Vol **42**, p 123-133.

Lefbvre, J. et Masella, R. (1990). Opportunités de valorisation de 3 sous-produits de transformation de l'industrie laitière. Centre de recherche STELA, bureau de liaison industrielle, université Laval, Sainte-Foy , P.Q, Canada, G1K 7P4 .

Lelieveld, H.L.M (1982). The use of continuous culture for selection and isolation of microorganisms producing extracellular enzymes adapted to extreme environments. Biotechnol. Bioeng., Vol **24**, p 1419.

Linko, P. et Linko, Y.Y. (1984). Industrial application of immobilised cells. CRC Crit. Rev Biotechnol. , Vol **1**, 289-338.

Linko, P. (1982). Biotechnology in whey valorisation. Food industries and the environment. Int. Symp. Budapest, Hungary.

Linko, P. (1981). Immobilised live cells. In " Advances in biotechnology". Moo-Young, Robinsson, C. et Vezzina, C. (Ed) , Vol **1**, p 711-716. Pergammon Press, New York.

Linko, P. (1980). In "Food process engineering. Linko, P.; Olbku, J. et Larinkari, J. (Ed), p 109. Applied Science Publication.

London, J. (1968). Regulation and function of lactate oxidation in *Streptococcus faecium*. J. Bacteriol., Vol **95**, p 1380-1387.

Luedeking, R. et Piret, E. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation Batch process at controlled pH. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., Vol **1** (4), p 393-412.

Mann, J.E. (1987). Whey utilisation. Part 1. Dairy industries International. Vol **52**, p 12-13.

Mann, J.E. (1982). Whey utilisation in foods. Dairy industries International. Vol **47**, p 22-23.

Marshall, R.K. et Harper, W.J. (1988). Whey protein concentrates. Bulletin of the International Dairy Federation #233 , p21-31.

Marshall, R.K. et Harper, W.J. (1980). Bacterial adhesion in natural environments. In " Microbial adhesion to surfaces". Berkeley, RC.W.; Lynch, J.M.; Rutter, P.R. et Vincent, B. (Ed). Ellis Horwood, Chichester.

Marsili, R.T. (1981). Monitoring bacterial metabolites in cultured buttermilk by high performance liquid chromatographic and head space gas chromatography. J. Chromatographic Sc., Vol **19**, p 451-456.

Marsili, R.T. ; Ostapenko, H. ; Simmons, R.E. et Green, D.E. (1981). High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. J. Food Science, Vol **46**, p 52-57.

Marwaha, S.S. ; Kennedy, J.F ; Tewari, H.K. et Redhu, A. (1989). Characterisation and treatment of dairy effluents by free and immobilized yeast. Process Biochem., Vol **24** (2), p 46-51.

Maubois, J.L. (1988) . Industrial fractionation of main whey proteins. Bulletin of the International Dairy Federation # 212, p 46-51.

Mehaia, M. et Cheryan, M. (1986). Production of lactic acid from Sweet-whey permeate in a membrane recycle bioreactor. Enz. Microbiol.. Technol., Vol **8**, p 289-296.

Mehaia, M. et Cheryan, M. (1987). Production of lactic acid from whey permeate concentrates. Process Biochem., Vol **22**, p 185-188.

Merrifield, R.B. et Woolley, D.W. (1958). The synthesis of peptides with streptogenin activity. J. Amer. Chem. Soc., Vol **80**, p 6635-6639.

Messing, R.A. (1982) . Immobilized microbes and high rate continuous waste processor for the production of high rate gas and the reduction of pollutants. Biotechnol. and Bioeng., Vol **24**, p 1115-1123.

Michaux, M. ; Paquot, M. ; Baijot, B. et Thonart, P. (1982). Continuous fermentation : Improvement of cell immobilization by zéta potential mesurment . In " Biotechnology and Biology Symposium". Gady E.C. (Ed.), John Willey and sons, N.Y., p 475-484.

Mobius J.(1975). The storage preservation of bagasse in bulk form without baling. UN/FAO Conf Cairo March 1975.

Modler, H.W. (1988). Developments of a continuous process for the production of ricotta cheese. J. of Dairy Science, Vol 71, p 2003-2009.

Moo-Young, M. et Blanch, H.W (1983). Kinetics and transport phenomena in biological reactor design. In " Foundations of biochemical engineering, Blanch Papoutsakis S. (Ed). ACS Symp. Ser. 207, p 335-354.

Moo-Young, M.; Lamptey, J. et Robinson, C.W (1980). Immobilisation of yeast cells on various supports for ethanol production. Biotechnology letters, Vol 2 (12), p 541-548.

Morgan, R. (1974) Wet bulk storage of bagasse. Proc. 15 th Congress ISSCT (South Africa) Haine et Gibson Ltd., Durban, 1793-1820.

Mosbach, K. et Nilson, K A (1983). A method for encapsulating biomaterial in bead polymers. Patent International Publication number W O 83/03102.

Mosbach, K. et Mosbach, R. (1966). Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic crosslinked polymers and their application in column techniques Acta Chem. Scand., Vol 20, p 2807.

Moulin, G. et Galzy P (1984). Whey as potential substrate for biotechnology. Biotechnol. Genetic Eng Reviews, Vol 1, p 347-374.

Moulin, G. ; Guillaume M. et Galzy, P. (1980). Alcool production by yeast in whey ultrafiltrate. Biotechnol. Bioeng., Vol XXII, p 1277-1281.

O'Leary, V. et Woychik J.H. (1976). Utilisation of lactose , Glucose and Galactose by a mixed culture of streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus in milk treated with lactase enzyme . Appl. Environ. Microbiol. Vol 32 : 89-94

Paturau, J.M.(1969). By products of the cane sugar industry. Elsevier Publishing company Co , Amsterdam , The Netherland 1969 p 26.

Pette, J.W et Lolkema, H. (1950). Peptides and bacterial growth. Netherlands Milk and Dairy journal, Vol 4, p 209.

Poznanski, S. ; Surazynski, A. et D'Obyrn, T. (1968). Activité de fermentation et de protéolyse de certaines souches de bactéries lactiques en présence d'acides gras . Le lait , Vol 48, p 261-274.

Premi, L. ; Sandine, W.E. et Elliker, P.R. (1972). Lactose Hydrolyzing enzymes of Lactobacillus species. Appl. Microbiol., Vol 24, p 51-57.

Radovich, J.M. (1985). Mass transfert effects in fermentations using immobilized whole cells. Enzyme Microbiol. Technol., Vol 7, p 2-10.

Reddy, C.A. ; Henderson, H.E. et Erdman, D. (1976). Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein. Appl. Envir. Microbiol., Vol 32, p769-776.

Richardson, G.H. ; Cheng, C.T. et Young, R. (1976). Lactic bulk culture system utilizing a whey based bacteriophage inhibitory medium and pH control. J. Dairy Sci., Vol 60 (3), p 378-386.

Rogers, L.A et Whittier, E.O (1928). Limiting factors inn the lactic fermentation. J. Bactriol., Vol XVI (4), p 211-229.

Rogers, L.A et Whittier, E.O (1931). The growth of bacteria in continuous flow of broth. J. Bactriol., Vol XX (2) p127-137.

Rogosa, M. (1974). Lactobacillus: In: Bergey's Manuel of determinative Bacteriology. 8 th Ed Buchanan R.E et Gibbons N.E. (Ed). The Williams and Wilkins Co, Baltimore.

Roukas, T. et Kotzekidou, P. (1991). Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized Lactobacillus casei and lactococcus lactis cells. Enzyme Microb. Technol., Vol 13, p 33-38.

Roy, D. ; Goulet, J. et Leduy, A. (1987). Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. J. Dairy Sci., Vol **70**, p 506-513.

Roy, D. ; Leduy, A. et Goulet, J. (1987). Kinetics of growth and lactic acid production from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Canadian J. Chem. Eng., Vol **65**, p 597-603.

Roy, D. ; Goulet, J. et Leduy, A. (1986). Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. Applied Microbiol. and Biotechnol., Vol **24** (3), p 206-213.

Ryu, Y.W. ; Navarro, J.M. et Durand, G. (1982). Comparative study of ethanol production by an immobilized yeast in a tubular reactor and in multistage reactor. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech., Vol **15**, p 1-8.

Salmon, M. (1981). Extraction et valorisation du lactose. La Technique laitière, Vol **952**, p 85-88.

Sanderson, G.W et Reed, G. (1986). Fermented products from whey and whey permeate. Proceedings of I.D.F seminar 8-9 october. New Dairy products via new technology, p 141-157.

Selby, S. ; Hillier, A.J. ; Lees, G.J. et Jago, G.R. (1975). The nature of the stimulation off the growth of *streptococcus lactis* by yeast extract. J. Dairy Res. Vol **32**, p 123-138.

Sharpe, E.M. (1962). Enumeration and studies of lactobacilli in food products . Dairy Science Abstracts, Vol **24** (4), p 165-171.

Sharpe, E.M. (1962). Taxonomy of the lactobacilli . Dairy Science Abstracts . March 1962, Vol **24** (3), p 109-118.

Schingoethe, D.J. (1976). Whey utilisation in animal feeding, a summary and evaluation. Journal of Dairy Science, Vol **59**, p 556-570.

Scott, K.J (1989). In " Micronutriments in milk products and milk based food products. Renner, E. (Ed). Elsevier Applied Science, London , p 114-123

Smith, J.S. ; Hillier, A.J. et Lees, G.J. (1975). The nature of the stimulation of the growth of streptococcus lactis by yeast extract. J. Dairy Res., Vol **42**, p 123-138.

Smoragiewicz, W.; Langlet, B. et Boutard, A. (1986). Revue de la valorisation du lactosérum comme moyen efficace de lutte contre la pollution du milieu. Sciences et techniques de l'eau, Vol **19** (3), p 277-281.

Stenroos, S.L.; Linko, Y.Y et Linko, P. (1982). Production of L. Lactic acid with immobilized L. delbruekii. Biotechnology letters, Vol **4** (3), p 159-164.

Stieber, R.W. et Gerhardt, P. (1981). Dialysis continuous process for ammonium -lactate fermentation. Biotech. Bioeng., Vol **23**, p 523-549.

Stieber, R.W. et Gerhardt, P. (1979). Dialysis continuous process for ammonium -lactate fermentation : Improved mathematical model and use of deproteinized whey. Appl. Environ. Microbiol. Vol **37** (3) p 487-495.

Stieber, R.W. ; Coulman, G.A. et Gerhardt, P. (1977). Dialysis continuous process for ammonium-lactate fermentation of whey : Experimental tests. Appl. Environ. Microbiol., Vol **34** (6) p733-739.

Tampion, M.D. (1987). Immobilized cells: Principles and applications. Cambridge University Press, p 135-139.

Tempest, D.W. et Wouters, J.T.M. (1981). Properties and performances of microorganisms in chemostat culture. Enzyme Microb. Technol., Vol **3** p283-290.

Tewari, H.K. ; Sethi, R.P. ; Sood, A. et Singh, L. (1985). Lactic acid from paneer whey by lactobacillus bulgaricus . J. Res. Punjab Agric. Univ., Vol **22**, p 89-98.

Thomas, T.D. et Batt, R.D. (1969). Degradation of cell constituents by starved streptococcus lactis in relation to survival. J. Gen. Microbiol., Vol **58**, p 347-362.

Thomas, T.D. et Millis, O.E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. Neth. Milk Dairy J., Vol **35**, p 474- 478.

Thompson, J. (1987). Regulation of sugar transport and metabolism in lactic acid bacteria . FEMS Microbiology Review, Vol **46**, p 221-231.

Thonart, P.H (1982). Microbiology of sugar cane bagasse. Enz. Microbiol. Technol. p191-194.

Thonart, P.H (1976). Sugar cane bagasse and microbiology J. Bacteriol., Vol (1) p 25-32.

Tuli, A. ; Sethi, R.P. ; Khanna, P.K. ; Marwaha, S.S. et Kennedy, J.F. (1985). Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. Enz. Microbiol. Technol., Vol **7**, p 164-168.

Tyagi, R.D. et Ghose, T.K. (1982). Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae* .1- Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. Biotechnol. Bioeng., Vol **XXIV**, p781-795.

Tyagi, R.D (1986). Evaluation of dairy industry waste (Cheese whey) as substrat of bioconversion. Scientific report . I.N.R.S-EAU . Quebec university.

Tyagi, R.D ; Kluepfel, D. et Couillard, D. (1990). Bioconversion of cheese whey to organic acid. In: Bioconversion of waste materials to industrial products. A.M. Martin (Ed.). Elseivers Sci. Publishers, London, New York.

Valles, E. ; Mocquot, G. (1968). Préparation de suspensions concentrées et congelées de bactéries lactiques thermophiles destinées à la fromagerie. Le lait Vol **49** p 631-643.

Vesser, R.A. ; VandenBos, M.J. et Ferguson, W.P. (1988). Lactose and its chemical derivatives. Bulletin of International Dairy Federation (IDF), Vol **233**, p 33-44.

Vienne, P. et Von Stockar, U.R.S. (1983). Alcohol from whey permeate : Strain selection , temperature and medium optimization. Biotechnol. Bioeng. Symp., Vol **13**, p 421-435.

Walter, K. (1980) Deterioration of bulk-stored bagasse and it's preservation by chemical treatment . Proceeding 17 Th congress ISSCT , UN/FAO.

Webb, C. (1986). Biomass holdup in immobilized cell reactors. In " Process engineering aspects of immobilized cell systems. Webb, C.; Black, G. et Atkinson, B. (Ed). Pergammon Press.

Wildenauer, F.X. et Winter, J. (1985). Anaerobic digestion off high-strenght acidic whey in a pH -controlled up-flow fixed film loop reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol **22**, p 367-372.

Wiseman, A. (1985). Principles of industrial enzymology : basis of utilization of soluble and immobilised enzymes in industrial processes. In " Handbook of enzyme biotechnology. John Wiley and Sons, N.Y., p 74-75.

Whittier, E.O. ; Rogers, L.A. (1931). Lactic acid fermentation. Ind. Eng. Chem., Vol **23** , p 532.

Wright, S.L. et Richardson, G.H. (1982). Optimization of whey-based media or nonfat dry milk-based media for production of pH controlled bulk lactic cultures. J. Dairy Sci., Vol **65** (10), p 1882-1889.

Zadow, J.G (1988) . Fermentation of whey and whey permeate. Bulletin of International Dairy Federation, # **233**, p 53-60.

Zall, R.R (1987) . Milk permeat from ultrafiltration. Bulletin of International Dairy Federation, # **212**, p 103.

ANNEXE I

**Résultats bruts des performances des cellules immobilisées
opérées dans des bioréacteurs sans contrôle de pH.**

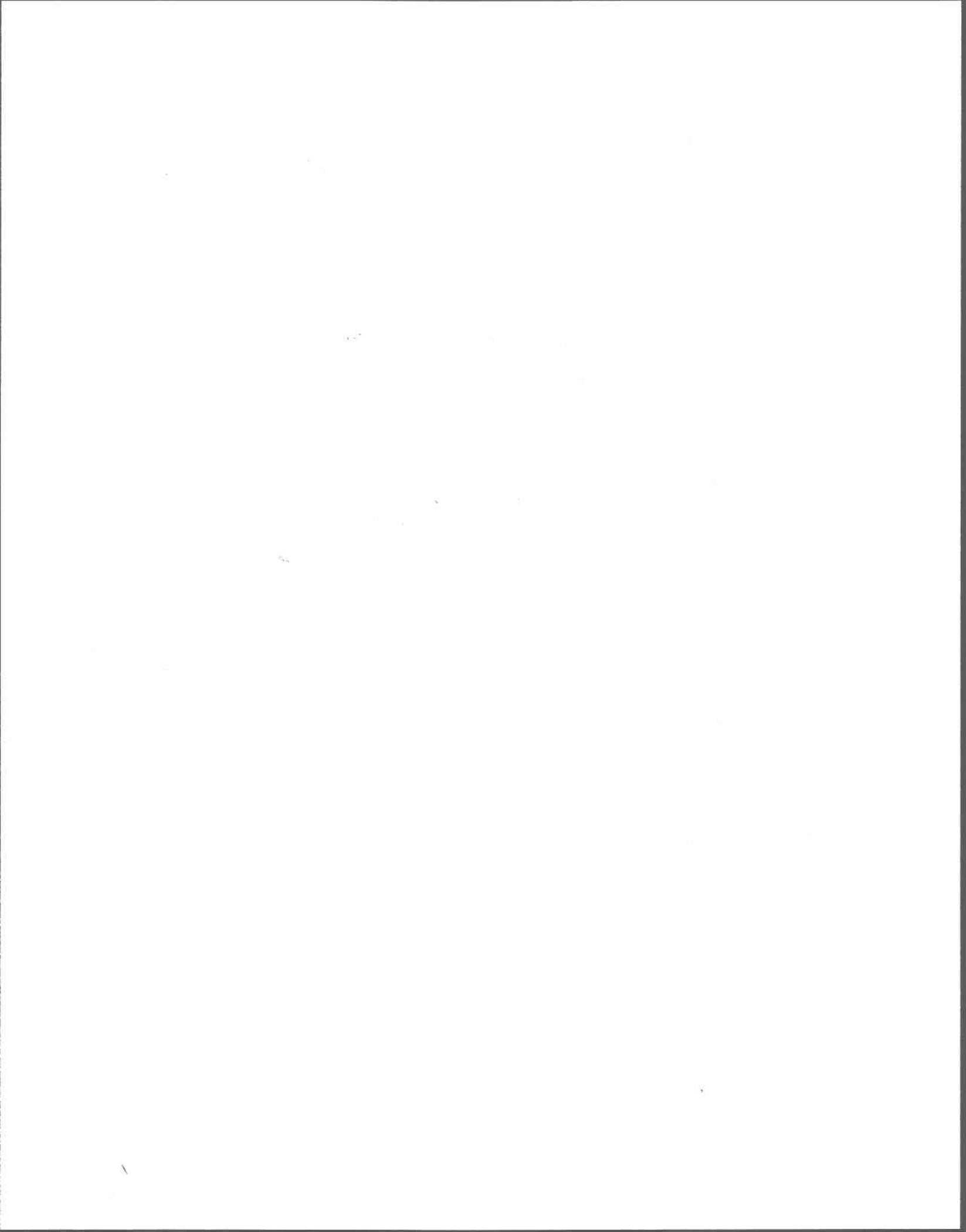


Tableau 12: Performances de *L.helveticus* ATCC 10797 immobilisées sur bagasse et opérées sans contrôle de pH, à T= 43°C.

D (h ⁻¹)	S (g/l)	P (g/l)	Productivité (g/l.h)	Conversion (%)	Rendement (g/g)	Productivité spécifique
0,182	18,700	26,300	4,790	58,400	0,979	0,292
0,257	15,100	29,900	7,690	66,400	0,974	0,469
0,507	19,400	25,600	12,980	56,890	0,979	0,791
0,804	26,300	18,700	15,030	41,500	0,975	0,916
1,200	29,000	16,000	19,200	35,500	0,975	1,171

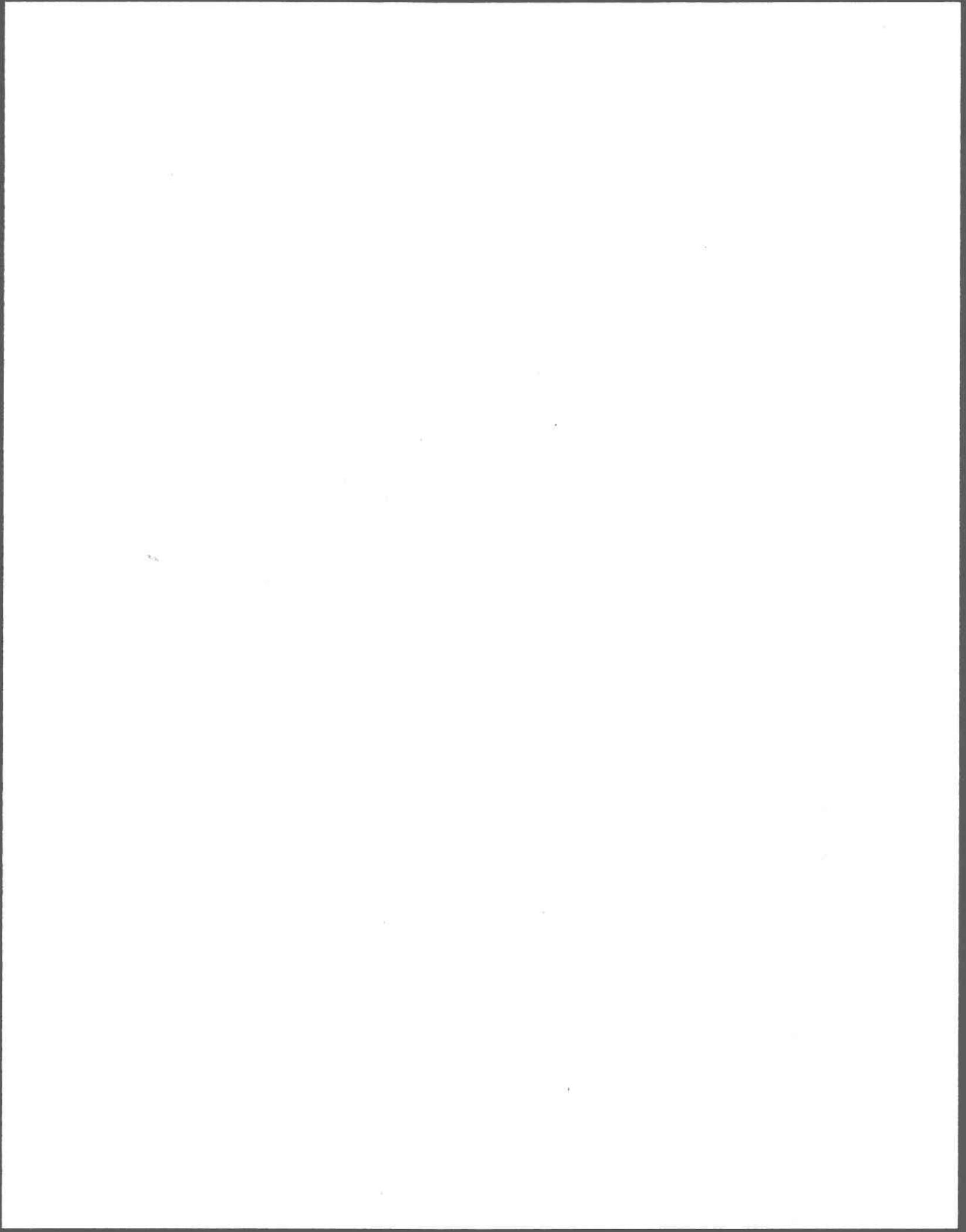
Tableau 13: Performances de *L.bulgaricus* Hansen 2217 immobilisées sur bagasse et opérées sans contrôle de pH, à T= 43°C.

D (h ⁻¹)	S (g/l)	P (g/l)	Productivité (g/l.h)	Conversion (%)	Rendement (g/g)	Productivité spécifique
0,300	8,130	29,900	9,000	80,810	0,979	0,620
0,600	12,170	25,460	15,000	68,800	0,975	1,030
1,4	25,100	12,200	17,000	32,970	0,975	1,170

Tableau 14: Performances de *L.bulgaricus* ATCC 10842 immobilisées sur bagasse et opérées sans contrôle de pH, à T= 43°C.

D (h ⁻¹)	S (g/l)	P (g/l)	Productivité (g/l.h)	Conversion (%)	Rendement (g/g)	Productivité spécifique
0,112	22,550	22,450	2,510	49,800	0,975	0,129
0,192	27,540	17,460	3,350	38,800	0,98	0,173
0,232	25,700	19,300	4,470	42,890	0,979	0,230
0,460	25,100	19,900	9,100	44,220	0,974	0,469
0,560	26,700	18,300	10,240	40,660	0,979	0,528
0,960	27,540	17,460	16,760	38,800	0,975	0,864
1,800	39,400	5,600	10,080	12,440	0,975	0,520

Chaque valeur mesurée correspond à 5 à 7 passages, et traduit l'état stable.



ANNEXE II

**Résultats bruts des performances des cellules
L. helveticus ATCC 10797 immobilisées et opérées
dans un bioréacteur avec contrôle de pH.**

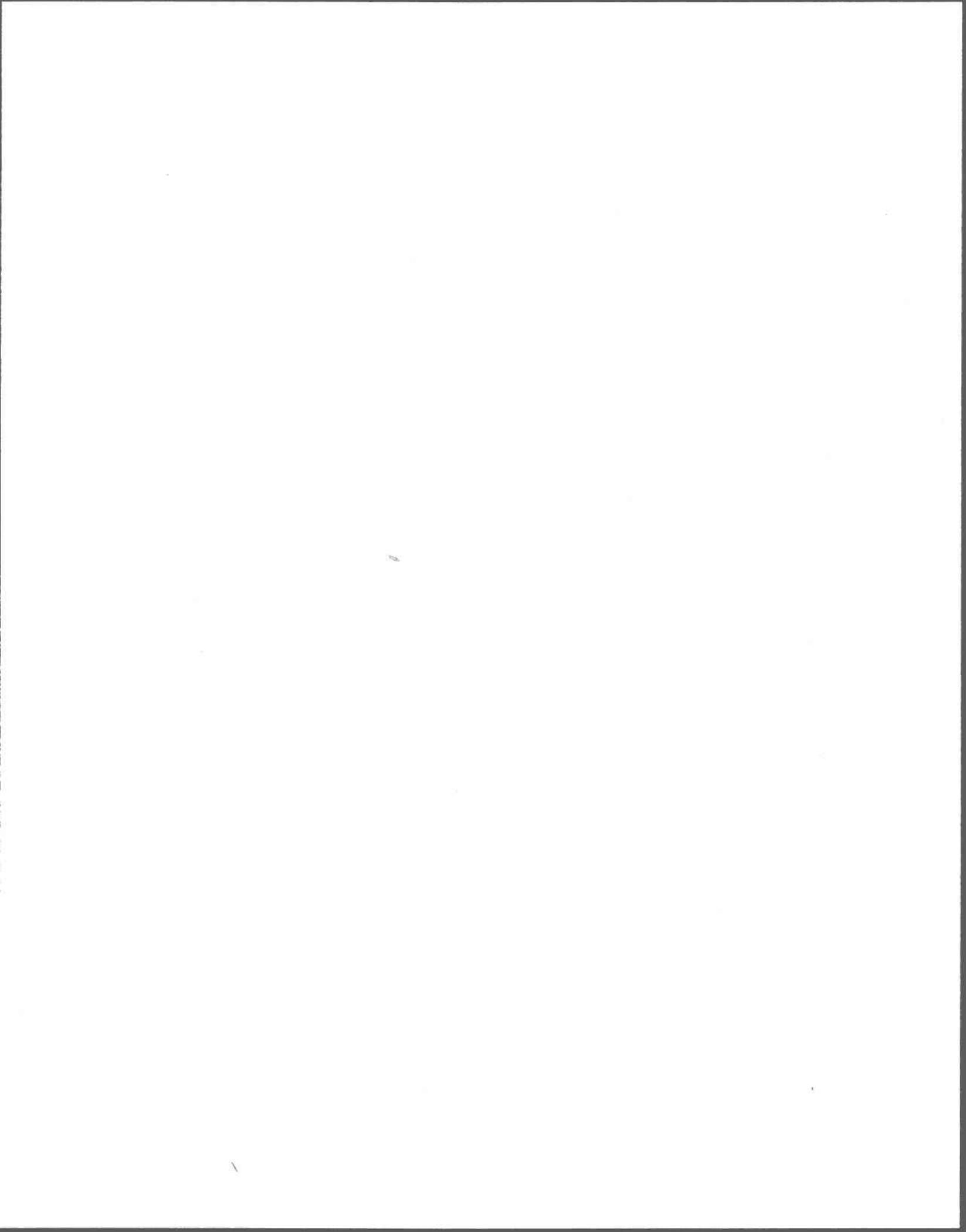


Tableau 15: Performances à $D=0.33 \text{ h}^{-1}$, à différentes hauteurs du bioréacteur contenant les cellules *L.helveticus* immobilisées avec contrôle de pH, à et $T^{\circ}= 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hauteur #	Durée (heure)	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H 1	3,000	40,910	4,090	9,090	1,350
H 2	3,000	38,910	6,080	13,530	2,000
H 3	3,000	30,580	14,420	32,040	4,750
H 4	3,000	26,180	18,810	41,810	6,200
H 1	ND	ND	ND	ND	ND
H 2	6,000	17,850	27,150	60,330	8,960
H 3	6,000	13,560	31,440	72,600	10,370
H 4	6,000	12,330	32,670	72,600	10,780
H 1	9,000	32,670	12,320	27,390	4,060
H 2	9,000	20,420	24,580	54,610	8,110
H 3	9,000	14,770	30,220	67,160	9,970
H 4	9,000	6,070	38,930	86,500	12,840

Tableau 16: Performances à $D=0.56 \text{ h}^{-1}$, à différentes hauteurs du bioréacteur contenant les cellules *L.helveticus* immobilisées avec contrôle de pH, à et $T^{\circ}= 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hauteur #	Durée (heure)	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H 1	11,000	38,080	6,950	15,450	3,900
H 2	11,000	32,150	12,840	28,540	7,200
H 3	11,000	23,970	21,020	46,700	11,790
H 4	11,000	23,970	21,020	46,700	11,790
H 1	13,000	36,680	8,310	18,470	4,660
H 2	13,000	33,530	11,460	25,470	6,420
H 3	13,000	17,400	27,590	61,330	15,480
H 4	13,000	17,400	27,590	61,330	15,480
H 1	15,000	40,420	4,570	10,160	2,560
H 2	15,000	32,300	12,690	28,200	7,100
H 3	15,000	22,190	22,800	50,670	12,790
H 4	15,000	18,650	26,350	58,550	14,780

Tableau 17: Performances à $D=0.737 \text{ h}^{-1}$, à différentes hauteurs du bioréacteur contenant les cellules *L.helveticus* immobilisées avec contrôle de pH, à et $T^{\circ}= 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Hauteur #	Durée (heure)	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H 1	17,000	40,200	4,790	10,640	3,000
H 2	17,000	36,360	8,630	19,180	6,360
H 3	17,000	27,550	17,440	38,760	12,850
H 4	17,000	24,300	20,690	45,990	15,240
H 1	19,000	40,560	4,430	9,860	3,260
H 2	19,000	36,540	8,450	18,780	6,220
H 3	19,000	29,150	15,840	35,200	11,670
H 4	19,000	27,240	17,760	39,460	13,080
H 1	21,000	40,120	4,800	10,800	3,530
H 2	21,000	35,510	9,480	21,070	6,980
H 3	21,000	27,120	17,870	39,720	13,670
H 4	21,000	21,450	23,540	52,310	17,340
H 1	23,000	38,900	6,080	13,510	4,480
H 2	23,000	34,800	10,200	22,660	7,500
H 3	23,000	26,460	18,540	41,200	13,660
H 4	23,000	20,990	24,001	53,330	17,690

Tableau 18: Performances à $D=1,488 \text{ h}^{-1}$, à différentes hauteurs du bioréacteur contenant les cellules *L.helveticus* immobilisées avec contrôle de pH, à et $T^\circ = 45 \text{ }^\circ\text{C}$.

Hauteur #	Durée (heure)	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H 1	25,000	37,750	7,240	16,100	10,780
H 2	25,000	37,750	7,200	16,100	10,780
H 3	25,000	32,350	12,640	28,090	18,800
H 4	25,000	29,170	15,820	35,160	23,540
H 1	27,000	38,690	6,300	14,010	9,380
H 2	27,000	38,660	6,330	14,060	9,420
H 3	27,000	36,420	8,570	19,060	11,170
H 4	27,000	27,330	27,660	39,250	26,280
H 1	29,000	40,860	4,130	9,180	6,150
H 2	29,000	40,860	4,130	9,180	6,150
H 3	29,000	40,860	4,130	9,180	6,150
H 4	29,000	26,860	18,134	40,290	26,983
H 1	31,000	ND	ND	ND	ND
H 2	31,000	39,920	7,550	7,550	11,280
H 3	31,000	37,490	7,509	11,170	16,680
H 4	31,000	21,420	23,570	52,380	35,070

ANNEXE III

**Résultats bruts des performances des cellules
L. bulgaricus Hansen 2217 immobilisées et opérées
dans un bioréacteur avec contrôle de pH**

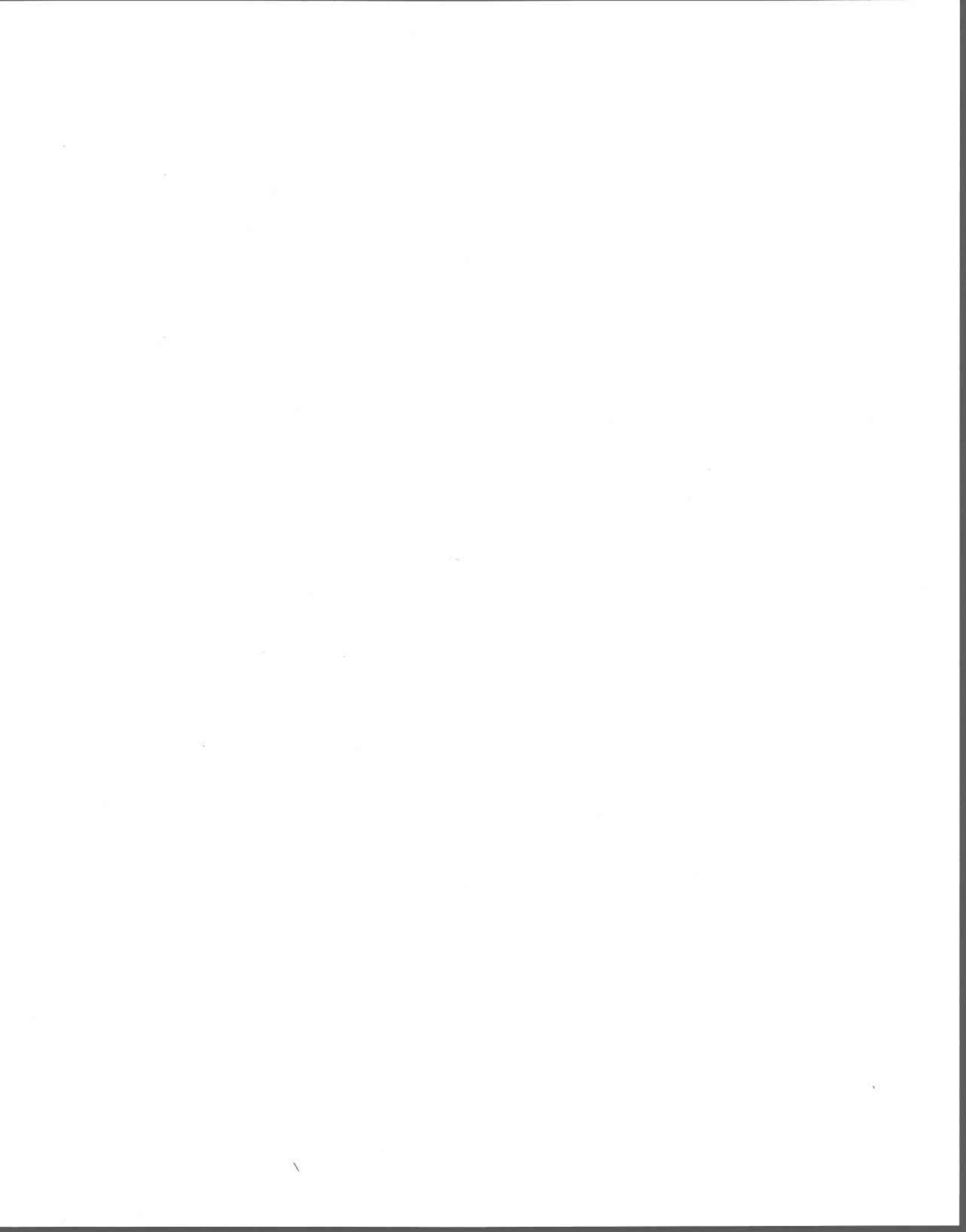


Tableau 19: Performances à différentes hauteurs du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisées opéré à $D=0.22h^{-1}$ $T^{\circ}=45^{\circ}C$ et contrôle de pH

Essai	Durée (Heure)	pH	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H1	5	4.6	31.4	13.6	30.2	2.7
H2		4.8	28.6	16.3	36.3	3.2
H3		5	18.6	26.3	58.5	5.2
H4		4.9	17.3	27.6	61.3	5.5
H1	15	4.6	30.9	14	31.3	2.8
H2		4.8	29.9	15.1	33.5	3.0
H3		4.8	25.6	19.3	43	3.8
H4		4.7	20	24.9	55.4	4.9
H1	20	4.4	35.1	10.9	21.8	1.9
H2		4.5	23.6	21.3	47.3	4.2
H3		4.6	17.2	26.8	61.8	5.5
H4		4.6	17.2	27.8	59.5	5.36

Tableau 20: Performances à différentes hauteurs du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisées opéré à $D=0.33 \text{ h}^{-1}$, $T^{\circ}=45^{\circ}\text{C}$ et contrôle de pH.

Essai	Durée (Heure)	pH	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H1	23	4.6	29.1	15.8	35.2	5.2
H2		4.8	22.1	22.8	50.7	7.5
H3		5	16.6	28.3	63	9.35
H4		4.9	13.9	31	68.9	10.2
H1	26	4.6	31.2	13.7	30.6	4.5
H2		4.8	23.4	21.5	47.9	7.1
H3		4.8	11.7	33.2	73.8	10.9
H4		4.7	10.1	34.8	77.4	11.4
H1	29	4.4	27.3	17.6	39.3	5.8
H2		4.5	16.6	28.3	63.1	9.3
H3		4.6	16	28	64	9
H4		4.6	15.5	29	65.5	9.7
H1	32		27.8	17.1	38.2	5.6
H2			13.6	31	69.7	10.2
H3			5.6	39.3	87.5	12.9
H4			5.6	39.3	87.5	12.9
H1	35		25.7	19.2	42.8	6.3
H2			13	31	69.7	10
H3			9.7	35.2	78.3	11.6
H4			8.4	36.5	81.2	12

Tableau 21: Performances à différentes hauteurs du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisées opéré à $D= 0.42 \text{ h}^{-1}$, $T^{\circ}= 45^{\circ}\text{C}$ et contrôle de pH.

Essai	Durée (Heure)	pH	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H1	38	4.6	33.6	11.3	25.3	4.7
H2		4.8	26.3	18.6	41.46	7.8
H3		5	22.6	22.3	49.7	9.4
H4		4.9	22.6	22.3	49.7	9.4
H1	41	4.6	25.8	19.1	42.6	8
H2		4.8	25.5	19.4	43.2	8
H3		4.8	25.4	19.5	43.5	8
H4		4.7	19.3	19.6	43.5	10.8
H1	44	4.4	28.2	16.7	37.3	7
H2		4.5	16.2	28.7	64	12
H3		4.6	16.2	28.7	64	12
H4		4.6	16.2	28.7	64	12
H1	47		24	20	46.5	8.7
H2			13.4	31.5	70	13.2
H3			12.8	32.11	71.3	13.5
H4			12.8	32.11	71.3	13.5

Tableau 22 Performances à différentes hauteurs du bioréacteur de *L. bulgaricus* immobilisées opéré à $D= 0.5 \text{ h}^{-1}$, $T^{\circ}= 45^{\circ}\text{C}$ et contrôle de pH.

Essai	Durée (Heure)	pH	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H1	49	4.6	33.7	11.2	25.1	5.6
H2		4.8	34	10.8	24.4	5.4
H3		5	33.6	11	25.3	5.5
H4		4.9	28.1	16.9	37.5	8.45
H1	51	4.6	32	12.9	28.8	6.4
H2		4.8	34.8	10.1	22.6	5
H3		4.8	31	13.8	30.8	6.9
H4		4.7	22.8	22.1	49.3	11.1
H1	53	4.4	26.1	18.8	42	9.4
H2		4.5	25.1	20.8	44.2	10.4
H3		4.6	32.3	12.6	28.2	6.3
H4		4.6	23.4	21.5	48	10.7
H1	55		25.1	19.8	44.1	9.9
H2			23.1	21.8	48.5	10.9
H3			20.6	24.3	54.2	12.2
H4			20.7	24.7	54	12.4

Tableau 23: Performances à différentes hauteurs du bioréacteur de *L.bulgaricus* immobilisées opéré à $D= 1.12 \text{ h}^{-1}$, $T^{\circ}= 45^{\circ}\text{C}$ et contrôle de pH.

Essai	Durée (Heure)	pH	Lactose (g/l)	Lactate (g/l)	Conversion (%)	Productivité (g/l.h)
H1	57	4.6	39.2	5.8	12.9	6.5
H2		4.8	26.5	18.4	41.1	20.6
H3		5	6.9	3.8	84.4	42.5
H4		4.9	18.3	26.7	59.4	29.9
H1	59	4.6	3.7	7.9	17.7	8.9
H2		4.8	26.4	18.5	41.1	20.7
H3		4.8	26.9	1.8	40.1	20.1
H4		4.7	25.7	19.2	42.8	21.6
H1	61	4.4	35.2	9.7	21.5	10.8
H2		4.5	27.7	17.2	38.4	19.3
H3		4.6	29.7	15.3	3.4	17.1
H4		4.6	27.7	17.2	38.4	19.3
H1	63		31.7	13.2	29.5	14.8
H2			3.2	12.6	28.8	14.1
H3			3.0	14.8	3.3	16.6
H4			28.37	16.6	36.9	18.5

