

**Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier**

**Optimisation des conditions de fermentation de la souche ES R2C2 pour la
valorisation du lactosérum**

Par

Dominique Pilote

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en
microbiologie appliquée**

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	François Shareck, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Claude champagne, Centre de Recherche et de Développement en Agriculture
Directeur de recherche	Claude Dupont, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Marcel Paquet, Université du Québec à Chicoutimi

© Droits réservés de Dominique Pilote, 2002

RÉSUMÉ.

La valorisation des sous-produits industriels par des procédés biologiques répond à un besoin actuel des industries du secteur agroalimentaire. Le lactosérum qui est issu de la production fromagère est un de ces produits. Sa composition lui confère une charge organique trop importante pour qu'il puisse être rejeté dans l'environnement sans traitement. Cependant, cette composition en fait aussi un milieu intéressant pour la croissance de bactéries lactiques. Étant donné que les bactéries lactiques utilisent les sucres pour leur croissance, la charge organique du lactosérum s'en trouve diminuée et les produits issus de la fermentation peuvent être récupérés et utilisés pour la valorisation. Dans le cadre de ce projet de maîtrise, les conditions optimales de croissance d'une souche de lactobacille dans le lactosérum ont été déterminées.

Le but du projet est de déterminer les conditions optimales de température, de pH, d'agitation et de ratio d'inoculation pour la croissance de la souche ES R2C2 dans le lactosérum ainsi que pour la production d'une matrice protéique malléable (MPM^{mc}) par l'utilisation d'un modèle mathématique. Cette méthodologie couramment utilisée en fermentation permet de déterminer avec précision et dans un nombre d'essais minimum, les conditions optimales de croissance d'un microorganisme ou paramètre de fermentation.

Le modèle mathématique utilisé est un plan central composite isovariant par rotation. Le plan comporte 27 essais qui servent à déterminer les effets principaux des quatre variables explicatives choisies, les interactions du premier degré (synergie) entre ces dernières, ainsi que l'erreur expérimentale. Les fermentations ont une durée de 96h et sont conduites en volume de 7 litres de lactosérum stérile. Les variables dépendantes suivies sont : la croissance bactérienne ; la production d'acide lactique ; les monosaccharides et disaccharides ; la production de MPM^{mc} ; le pourcentage (p/p) de solides totaux dans le MPM^{mc} ; le pourcentage (p/p) de cendres retrouvées dans le MPM^{mc}.

IV

Le modèle utilisé montre que les variables explicatives ayant le plus d'influence sur les variables dépendantes étudiées sont le ratio d'inoculation, la température, ainsi que le pH. L'agitation est la variable explicative ayant le moins d'influence. Les analyses montrent que les conditions optimales sont 39 °C pour la température, 5.3 pour le pH, 15 % (v/v) pour le ratio d'inoculation et 10 rpm pour l'agitation. Dans ces conditions, la croissance bactérienne maximale atteinte est de $3,3 \times 10^8$ bactéries/mL, la concentration d'acide lactique maximale est de 66 mM, alors que la concentration en lactose diminue de 99 % après 96 heures de fermentation et que la production de MPM^{mc} est de 33 g/L.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
TABLE DES MATIÈRES.....	V
Liste des tableaux.....	IX
Liste des figures.....	X
1 INTRODUCTION.....	1
2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
2.1 LACTOSÉRUM : DÉFINITION ET COMPOSITION.....	3
2.2 TRAITEMENTS.....	4
2.2.1 <i>Procédés physico-chimiques</i>	5
2.2.2 <i>Procédés biologiques</i>	8
2.3 LES BACTÉRIES LACTIQUES.....	10
2.3.1 <i>Caractéristiques générales</i>	10
2.3.2 <i>Classification</i>	11
2.3.3 <i>Physiologie</i>	11
2.3.4 <i>Cinétique de croissance et de fermentation</i>	12
2.3.5 <i>Lactobacillus</i>	12
2.4 EXOPOLYSACCHARIDES (EPS).....	13
2.4.1 <i>Exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques</i>	14
2.4.2 <i>Mécanismes de synthèse</i>	14
2.4.3 <i>Cinétique de production des exopolysaccharides</i>	15
2.4.4 <i>Utilisations</i>	15
2.5 KÉFIR ET KÉFIRAN.....	16
2.6 GELS ALIMENTAIRES.....	17

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	19
3.1 SOUCHE BACTÉRIENNE UTILISÉE	19
3.1.1 <i>Provenance de la souche</i>	19
3.1.2 <i>Conservation des souches</i>	19
3.2 MILIEUX DE CULTURE	19
3.2.1 <i>Rogosa Cheese Whey</i>	20
3.2.2 <i>TSA et TSA II 5 % SB</i>	21
3.2.3 <i>Lactosérum</i>	21
3.3 CONDITIONS DE CULTURE.....	22
3.3.1 <i>Précultures</i>	22
3.3.2 <i>Fermenteurs 14L</i>	22
3.4 PLAN D'EXPÉRIENCE	22
3.4.1 <i>Analyses statistiques</i>	26
3.5 MÉTHODES ANALYTIQUES.....	26
3.5.1 <i>Suivi de la concentration en acide lactique</i>	26
3.5.2 <i>Suivi des monosaccharides et disaccharides</i>	27
3.5.3 <i>Suivi des sucres totaux</i>	28
3.5.4 <i>Dénombrement bactérien</i>	29
3.5.5 <i>Évaluation de la production de MPM^{mc}</i>	30
3.5.6 <i>Caractérisation sommaire des MPM^{mc}</i>	30
3.5.7 <i>Détection des contaminations</i>	31
4 RÉSULTATS.....	33
4.1 CALCULS DES MODÈLES	34
4.1.1 <i>Dénombrement bactérien</i>	35
4.1.2 <i>Production d'acide lactique</i>	37
4.1.3 <i>Concentration en lactose</i>	40
4.1.4 <i>Production de MPM^{mc}</i>	43
4.2 EFFETS SPÉCIFIQUES AUX VARIABLES EXPLICATIVES	45
4.2.1 <i>Température</i>	45

4.2.2	<i>pH</i>	48
4.2.3	<i>Agitation</i>	51
4.2.4	<i>Ratio d'inoculation</i>	53
4.3	INTERACTIONS DU PREMIER DEGRÉ	56
4.3.1	<i>Dénombrement bactérien</i>	56
4.3.2	<i>Production d'acide lactique</i>	57
4.3.3	<i>Concentration en lactose</i>	58
4.3.4	<i>Production de MPM^{mc}</i>	59
4.4	VALIDATION DES MODÈLES.....	60
4.4.1	<i>Dénombrement bactérien</i>	60
4.4.2	<i>Production d'acide lactique</i>	64
4.4.3	<i>Concentration en lactose</i>	67
4.4.4	<i>Production de MPM^{mc}</i>	70
4.5	SUIVI DES MONOSACCHARIDES	73
4.6	SOLIDE TOTAUX ET CENDRES	73
5	DISCUSSION	74
5.1	ANALYSE DES RÉSULTATS.....	76
5.2	CROISSANCE BACTÉRIENNE.....	77
5.3	PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE	79
5.4	UTILISATION DES SUCRES.....	82
5.5	PRODUCTION DE MPM ^{MC}	85
6	CONCLUSION	88
7	REMERCIEMENTS	91
8	RÉFÉRENCES	92
9	ANNEXE 1	97
10	ANNEXE 2	99
11	ANNEXE 3	113

VIII

12 ANNEXE 4.....	127
13 ANNEXE 5.....	141
14 ANNEXE 6.....	155

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. COMPOSITION DES DIFFÉRENTS TYPES DE LACTOSÉRUM	4
TABLEAU 2. HORAIRE DE PRÉLÈVEMENT POUR LES FERMENTATIONS	20
TABLEAU 3. DÉFINITION DES INTERVALLES DES CODES DE NIVEAUX POUR LES DIFFÉRENTES VARIABLES EXPLICATIVES.	24
TABLEAU 4. DÉFINITION DES DIFFÉRENTS ESSAIS PAR RAPPORT AUX CODES DE NIVEAUX ET AUX VALEURS EXPÉRIMENTALES.	25
TABLEAU 5. PROGRAMME D'INJECTION DES SOLVANTS EN VUE DE LA SÉPARATION DES SUCRES.	29
TABLEAU 6. TABLEAU DES COEFFICIENTS DE RÉGRESSION DES MODÈLES DÉCRIVANT LA CROISSANCE BACTÉRIENNE (BACTÉRIES/ML) DURANT LES FERMENTATIONS. TEMPÉRATURE (°C), RATIO (%), AGITATION (RPM)	36
TABLEAU 7. TABLEAU DES COEFFICIENTS DE RÉGRESSION DES MODÈLES DÉCRIVANT LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE (MM) DURANT LES FERMENTATIONS.	39
TABLEAU 8. TABLEAU DES COEFFICIENTS DE RÉGRESSION DES MODÈLES DÉCRIVANT LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE (MM) DURANT LES FERMENTATIONS.	42
TABLEAU 9. TABLEAU DES COEFFICIENTS DE RÉGRESSION DES MODÈLES DÉCRIVANT LA PRODUCTION DE MPM ^{MC} (G/L) DURANT LES FERMENTATIONS.	44

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	DIAGRAMME DES DIFFÉRENTS PROCÉDÉS DE VALORISATION DU LACTOSÉRUM (ADAPTÉ DE [6] ET [12])	5
FIGURE 2.	PHOTOGRAPHIE NUMÉRIQUE D'UNE UNITÉ DE FERMENTATION SF-214.	23
FIGURE 3.	INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR QUATRE DES VARIABLES DÉPENDANTES ÉTUDIÉES : PANNEAU A CROISSANCE BACTÉRIENNE, B PRODUCTION DE MPM ^{MC} , C PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE, D UTILISATION DU LACTOSE.	47
FIGURE 4.	INFLUENCE DU pH SUR QUATRE DES VARIABLES DÉPENDANTES ÉTUDIÉES : PANNEAU A CROISSANCE BACTÉRIENNE, B PRODUCTION DE MPM ^{MC} , C PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE, D UTILISATION DU LACTOSE.	50
FIGURE 5.	INFLUENCE DE L'AGITATION SUR QUATRE DES VARIABLES DÉPENDANTES ÉTUDIÉES : PANNEAU A CROISSANCE BACTÉRIENNE, B PRODUCTION DE MPM ^{MC} , C PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE, D UTILISATION DU LACTOSE.	52
FIGURE 6.	INFLUENCE DU RATIO D'INOCULATION SUR QUATRE DES VARIABLES DÉPENDANTES ÉTUDIÉES : PANNEAU A CROISSANCE BACTÉRIENNE, B PRODUCTION DE MPM ^{MC} , C PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE, D UTILISATION DU LACTOSE.	55
FIGURE 7.	COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DU DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN (LOG(BACTÉRIES/ML)) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 28 ET 29.	62
FIGURE 8.	COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DU DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN (LOG(BACTÉRIES/ML)) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 25, 26 ET 27.	63
FIGURE 9.	COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE LACTIQUE (MM) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 28 ET 29.	65
FIGURE 10.	COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE LACTIQUE (MM) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 25, 26 ET 27.	66
FIGURE 11.	COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE (MM) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 28 ET 29.	68

- FIGURE 12. COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE (MM) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 25, 26 ET 27. 69
- FIGURE 13. COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA PRODUCTION DE MPM^{MC} (G/L) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 28 ET 29. 71
- FIGURE 14. COURBES CALCULÉES ET EXPÉRIMENTALES DE LA VARIATION DE LA PRODUCTION DE MPM^{MC} (G/L) EN FONCTION DU TEMPS (HEURE) POUR LES ESSAIS 25, 26 ET 27. 72

INTRODUCTION

Un des défis de notre société est d'arriver à recycler les déchets issus de nos industries en de nouveaux produits afin de diminuer au minimum les dommages causés à l'environnement ainsi que les pertes énergétiques. Dans cette optique, les biotechnologies peuvent être utilisées pour développer de nouveaux procédés efficaces de valorisation des sous-produits provenant des industries agroalimentaires.

Parmi ces sous-produits, le lactosérum, qui est issu de l'industrie fromagère, pose un problème environnemental croissant. En ce qui a trait à la production mondiale de lactosérum, elle atteignait 135 millions de tonnes en 1992 avec une augmentation constante de 2 % par année [1]. Étant donné que la charge organique du lactosérum est élevée et que les normes environnementales sont très sévères, les industries sont forcées de développer de nouvelles solutions de remplacement. Ces dernières visent à écouler les volumes de lactosérum toujours grandissants ainsi qu'à développer de nouveaux marchés pour l'utilisation directe du lactosérum et de ses dérivés à des fins alimentaires.

À l'heure actuelle, les grandes industries laitières ont à leur disposition diverses technologies qui permettent de rentabiliser les traitements de leurs effluents. Beaucoup de ces technologies sont dirigées vers la valorisation des protéines sériques qui ont une grande valeur nutritionnelle et commerciale. Les profits générés par ces traitements permettent ensuite d'écouler les perméats dans des avenues moins avantageuses.

Cependant, les petites fromageries ont des volumes de lactosérum journalier insuffisants pour rentabiliser de telles opérations. Elles dépendent donc des grandes industries ou d'autres industries comme les porcheries pour écouler leur lactosérum [2]. De plus, le lactosérum est vendu à perte et selon le type de technologie, de lourds investissements sont requis afin d'assurer la préservation du lactosérum.

À ce jour, peu de biotechnologies utilisant directement le lactosérum sont disponibles pour traiter de petits volumes. La plupart des technologies utilisent soit des lactosérums reconstitués à partir de poudres, soit des perméats issus des technologies de

filtration ou encore des lactosérums enrichis. Étant donné cette situation, les producteurs fromagers de moindre importance doivent se tourner vers l'utilisation ou la mise au point de technologies plus avantageuses à petite échelle.

Les petits producteurs fromagers représentent 95 % des fromageries québécoises et produisent 18 % du fromage du marché québécois. Ils ont en moyenne une production de 14 000 kg de fromage par jour et doivent donc écouler de façon journalière 150 000 litres de lactosérum [3]. L'élaboration d'une nouvelle technologie doit donc prendre en compte l'utilisation directe du lactosérum, être réalisable à petite échelle et dans une période de temps la plus courte possible. De plus, les résidus issus de cette technologie doivent avoir une charge organique minimale afin d'être rejetés dans l'environnement ou d'être acheminés dans un système de traitement des eaux.

Des travaux antérieurs réalisés par Technologie Bioloactis inc. ont montré qu'il était possible d'obtenir un gel à la suite de la fermentation du lactosérum par un consortium bactérien. Le gel obtenu est constitué de protéines, d'exopolysaccharides et de micro-organismes. Cependant, l'utilisation du consortium amenait une variation dans le rendement et dans la qualité du gel produit.

Afin de stabiliser la production ainsi que la qualité du gel, des souches de microorganismes ont été isolées du consortium. Ces souches ont été identifiées au groupe des lactobacilles. L'utilisation de ces souches en culture pure dans le lactosérum devrait permettre de stabiliser le rendement et maintenir la qualité du gel. Le but du projet est donc d'optimiser les conditions de culture d'une des souches en culture pure dans le lactosérum.

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Lactosérum : Définition et composition

Le lactosérum est souvent considéré comme un dérivé de la fabrication des fromages [4], mais il devrait plutôt être considéré comme un sous-produit de l'industrie fromagère. Il est produit selon un ratio moyen de 9 litres de lactosérum par kilogramme de fromage et contient 55 % des constituants initiaux du lait. Il est une excellente source de plusieurs minéraux facilement assimilables par les humains comme le calcium, le phosphore, le potassium et le sodium. C'est aussi une bonne source de vitamines du complexe B, la riboflavine et l'acide pantothénique [5, 6]. Cependant, la composition et les caractéristiques du lactosérum varient en fonction de la source et du procédé de fabrication [4, 7].

Les différents lactosérums sont généralement classés en deux catégories ; les lactosérums doux de pH 6,6 -5,0 issus de la fabrication des fromages à pâte pressée ; les lactosérums acides de pH inférieur à 5 provenant de la fabrication des fromages à pâte molle ou fraîche [4, 6-8]. Le tableau 1 présente la comparaison de la composition des différents types de lactosérums.

Les protéines majeures présentes dans le lactosérum sont la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine. D'autres protéines comme les immunoglobulines, l'albumine bovine, la lactoferrine sont présentes à des niveaux inférieurs [4]. La composition riche en acides aminés essentiels des protéines sériques leur confère une haute valeur nutritionnelle. De plus, elles ont d'excellentes propriétés fonctionnelles tant au niveau de la solubilité, des propriétés moussantes, émulsifiantes ou gélifiantes. Les caractéristiques des protéines sériques en font des ingrédients de grande valeur pour la formulation de différents produits alimentaires ou cosmétiques [4, 6, 7].

Tableau 1. Composition des différents types de lactosérum

Composants	Lactosérum doux	Lactosérum acide
	pH 6,6 -5,0	pH <5,0
Solides totaux	6,35 %	6,5 %
Eau	93,7 %	93,5 %
Gras	0,5 %	0,04 %
Protéine	0,8 %	0,75 %
Lactose	4,85 %	4,5 %
Cendres (minéraux)	0,5 %	0,8 %
Acide lactique	0,05 %	0,5 %

Adapté de [9]

Le lactose qui est le composant majeur des solides du lactosérum, a une valeur nutritionnelle et commerciale faible [1, 7]. La teneur en lactose du lactosérum lui confère une charge organique de l'ordre de 30 à 70 g/L de DB05 [3, 6]. Considérant que la production québécoise de lactosérum est estimée à 1467 millions de litres par an, le lactosérum représente un problème environnemental important [2, 10]. En raison de sa composition, l'utilisation efficace du lactosérum est donc inévitablement liée à l'utilisation du lactose [7]

2.2 Traitements

Le lactosérum a été très longtemps considéré comme un déchet et était directement déversé dans l'environnement [4]. Cependant, pour des considérations économiques et l'apparition de normes environnementales plus sévères, le lactosérum est devenu un coproduit de l'industrie fromagère. Plusieurs technologies de valorisation du lactosérum ont été développées afin de répondre aux nouvelles contraintes. Ces technologies sont principalement dirigées vers la récupération des protéines sériques, le séchage du lactosérum et l'utilisation du lactose [7, 9, 11]. Dans une moindre mesure, le lactosérum peut directement être utilisé en alimentation animale [2]. Les différents traitements du lactosérum impliquent des procédés physico-chimiques ou des procédés biologiques et ne sont généralement avantageux que pour traiter de grands volumes. La figure 1 illustre un résumé des avenues majeures de la valorisation du lactosérum.

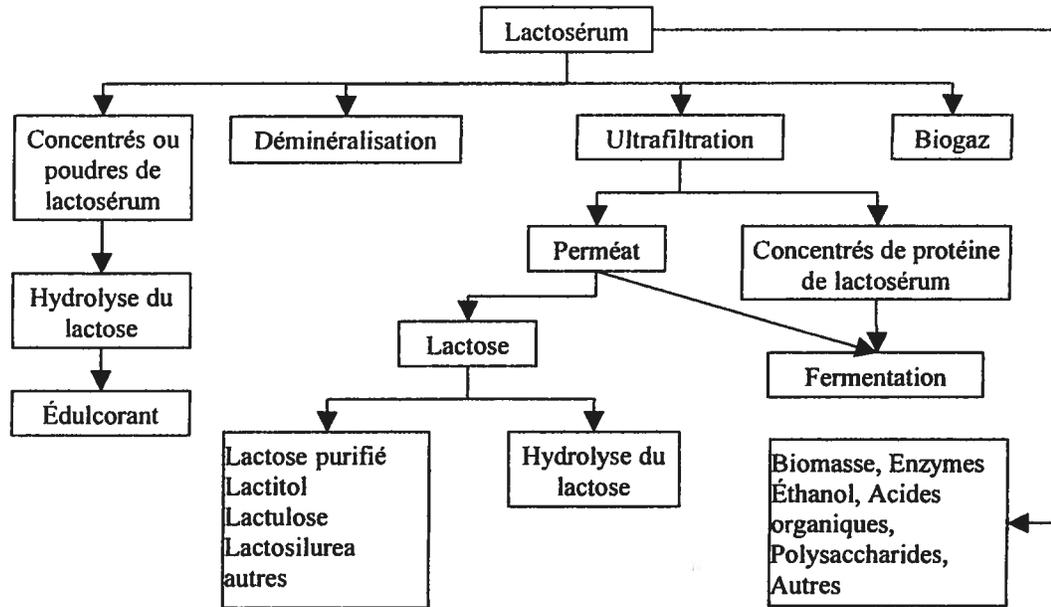


Figure 1. Diagramme des différents procédés de valorisation du lactosérum (adapté de [6] et [12])

2.2.1 PROCÉDÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Les procédés de traitement physico-chimique du lactosérum regroupent toutes les technologies qui utilisent des méthodes de chauffage, séchage, filtration ou tout autre méthode abiotique.

2.2.1.1 Production de concentrés protéiques

Les technologies généralement rencontrées reposent sur une séparation des composants à l'aide d'une membrane filtrante. La technologie la plus répandue dans cette catégorie est l'ultrafiltration. Cette technique permet la concentration des molécules de tailles supérieures à 1 kDa et jusqu'à 15 kDa selon le type de membrane. Les produits obtenus ont une concentration en protéines de 40 à 80 %. Les techniques de nanofiltration et d'osmose inverse utilisent des membranes de porosité comprise entre 0,5 et 1 nm. Elles

permettent l'élimination du lactose et une concentration en protéines de l'ordre de 90 % [4].

Étant donné la haute valeur biologique des protéines du lactosérum et leurs bonnes propriétés fonctionnelles, les concentrés de protéines ont une bonne valeur commerciale et sont largement utilisés en alimentation humaine [4]. Cependant, les technologies de séparation des protéines génèrent des effluents ayant des concentrations en lactose pouvant atteindre 85 % des solides totaux du lactosérum. Les perméats issus de ces procédés doivent donc être traités par d'autres technologies afin de réduire leur concentration en lactose [5].

2.2.1.2 *Procédés de séchage*

Les procédés de séchage sont les mêmes que ceux utilisés pour la production de poudre de lait. Ils permettent de faciliter l'utilisation du lactosérum et d'en prolonger la conservation [2]. Les solides totaux du lactosérum sont premièrement concentrés à 40-70 % par des techniques d'évaporation ou d'osmose inverse. Ils sont par la suite séchés par atomisation ou sur des rouleaux pour obtenir une poudre avec une teneur en humidité inférieure à 5 % [7, 11].

Les procédés de séchage sont appliqués sur les lactosérums complets ou sur tout autre résidu issu des autres procédés de traitement (perméats). Ces poudres sont principalement utilisées en alimentation animale et dans une moindre proportion dans l'alimentation humaine [6]. Les facteurs qui limitent l'utilisation de ces poudres dans l'alimentation humaine sont leur haute teneur en sel, leur faible teneur en protéine ainsi que la présence du lactose [6, 7].

2.2.1.3 *Déminéralisation*

La réduction de la teneur en minéraux du lactosérum augmente ses possibilités d'utilisation dans l'industrie alimentaire. Cette diminution (déminéralisation) est réalisée par échange ionique (échange non préférentiel d'ions), par électrodialyse (échange

préférentiel d'ions monovalents). Cependant, ces procédés sont très coûteux et génèrent des effluents difficilement récupérables [7, 12]. Plus récemment, des membranes à osmose inverse ouverte ont été développées et permettent une déminéralisation plus efficace. Ces membranes laissent passer l'eau et les sels tout en retenant les autres composants du lactosérum [7, 11]. Le lactosérum déminéralisé est ensuite séché et peut facilement être utilisé en alimentation humaine.

2.2.1.4 Séparation et hydrolyse du lactose

Le lactose est un disaccharide constitué des monosaccharides de glucose et de galactose liés de façon covalente par un lien *O*-glycosidique. Le lactose est présent sous deux formes isomériques ; α -lactose et β -lactose. Les formes diffèrent par l'arrangement spatial du groupe hydroxyle du carbone anomérique du glucose. Les deux isomères diffèrent au niveau de leur solubilité, de la forme du cristal, du point de fusion et au niveau de leurs effets physiologiques [13].

Le lactose peut être purifié du lactosérum brut ou des perméats par cristallisation. Le lactose purifié a la consistance d'une mélasse et est utilisé dans des procédés alimentaires et dans l'industrie pharmaceutique[7]. L'étape de la cristallisation est suivie des étapes de séparation, de raffinage et une dernière de séchage afin d'obtenir une poudre uniforme. La valeur nutritive du lactose cristallisé est grandement augmentée à la suite de son dessalage [6, 12]. Étant donné la faible valeur édulcorante du lactose et le développement d'intolérance chez une certaine partie de la population humaine, le marché mondial du lactose est limité et d'autres alternatives doivent être envisagées [6, 14].

L'hydrolyse du lactose permet en revanche d'augmenter les possibilités d'utilisation en alimentation. Le pouvoir édulcorant du glucose et du galactose est de beaucoup supérieur à celui du lactose. De plus, l'hydrolyse permet d'obtenir des produits sans lactose pour la population intolérante. La texture de certains produits laitiers, comme les crèmes glacées, peut aussi être améliorée par l'hydrolyse du lactose qui empêche la

formation de cristaux [6, 12]. L'hydrolyse du lactose peut-être enzymatique, par la β -galactosidase, ou être obtenu par des traitements chimiques [7, 12].

2.2.2 PROCÉDÉS BIOLOGIQUES

Divers procédés de fermentation du lactosérum sont décrits dans la littérature. Des procédés de production d'enzymes, de biomasse, de biogaz, d'éthanol, de vitamines et autres produits ont été évalués [5-7]. Les procédés de traitement biologique du lactosérum visent généralement la formation de nouveaux produits par l'utilisation efficace du lactose comme source de carbone. D'autres traitements biologiques ont aussi été étudiés pour l'utilisation des composants inorganiques comme le phosphore et l'azote [15].

La fermentation du lactosérum n'est pas facilement réalisable puisque le nombre de microorganismes pouvant métaboliser le glucose et le galactose est de beaucoup supérieur au nombre de micro-organismes pouvant utiliser directement le lactose comme source de carbone [6]. Ce sont les levures qui sont les micro-organismes le plus utilisés pour la fermentation du lactosérum [1]. Cependant, un nombre grandissant de technologies utilisant d'autres micro-organismes, comme les bactéries lactiques, sont étudiées [5, 16-18].

2.2.2.1 Production d'éthanol et de biogaz

Plusieurs distilleries utilisant le lactosérum pour la production d'éthanol sont en activité en Irlande, aux États-Unis et en Nouvelle-Zélande. Les rendements obtenus avec du lactosérum non concentré sont faibles et une augmentation de la concentration en lactose est nécessaire afin d'obtenir un taux de conversion acceptable [6]. Une production d'éthanol supérieure à 15g / L x h peut être obtenue lorsque des levures sont immobilisées, qu'un système de fermentation en continu est utilisé et que la concentration de lactose dans le lactosérum est augmentée. Dans ces conditions, plus de 90 % du lactose initial est utilisé [1].

La fermentation anaérobie du lactosérum permet la production de biogaz comme le méthane qui peuvent être utilisés directement comme source d'énergie. La production de biogaz en fermentation anaérobie donne de bons rendements, plusieurs installations à grande échelle sont en fonction. Cependant, les effluents produits par la production d'éthanol et de biogaz ne répondent pas aux critères écologiques et des traitements supplémentaires sont requis [6, 7].

2.2.2.2 *Production d'acides organiques : acide lactique*

Plusieurs acides organiques (acétique, propionique, lactique, lactobionique, citrique, gluconique, etc.) peuvent être obtenus par la fermentation du lactosérum à l'aide de différents micro-organismes et procédés [5, 6]. Les bactéries, de la famille des *Lactobacillaceae*, sont les micro-organismes les plus avantageux pour la production d'acide lactique. Des rendements de 0,9 g d'acide lactique par gramme de lactose ont été obtenus comparativement à la moitié pour la production d'éthanol (0.45-0.5 g/g) [5]. La fermentation lactique du lactosérum amène principalement à deux débouchées : la production d'acide lactique, et le lactosérum fermenté. Dans ce dernier cas, lorsque la fermentation est réalisée avec le NH_4OH comme neutralisant, le produit obtenu peut être utilisé en alimentation animal (FACW) [19].

2.2.2.3 *Production de biomasse*

La production de biomasse est utilisée depuis les années 1940. La biomasse produite sert généralement à augmenter la valeur nutritive de certains aliments servant en alimentation animale et humaine. Les micro-organismes utilisés sont des levures, comme *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis bovina* ainsi que certaines espèces de *Candida* [6, 7]. L'utilisation de cultures mixte a aussi été étudiée afin d'augmenter le rendement en biomasse [7]. La production de biomasse permet de diminuer la DBO_5 de façon comparable à la production de biogaz et de façon supérieure à la production d'éthanol [6].

2.2.2.4 *Production de polysaccharides*

L'utilisation du lactosérum comme milieu pour la production d'exopolysaccharides (EPS) n'est pas très répandue. La production d'EPS a été étudiée chez quelques espèces de microorganismes comme *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Xanthomonas*, etc. Ce n'est que depuis les dernières années que la production d'EPS par les bactéries lactiques est envisagée. Cependant, dans la plupart des cas, des additifs sont nécessaires à la croissance des bactéries et à la production d'EPS dans le lactosérum [20-23].

2.3 Les bactéries lactiques

Il n'existe pas de définition précise de ce que sont les bactéries lactiques. La plupart des caractéristiques qui sont utilisées pour définir le groupe sont établies dans des conditions standards et sont donc sujettes à des variations en plus des exceptions qui y sont retrouvées [24]. Beaucoup de ces caractères sont typiques et servent à définir le cœur du groupe des bactéries lactiques [25].

Les bactéries lactiques ont une grande importance en alimentation. Elles sont généralement reconnues comme sécuritaires pour la santé humaine et sont utilisées pour les caractéristiques de goût, d'arôme, de texture et de conservation qu'elles confèrent aux aliments [26]. Elles sont notamment retrouvées dans les laits fermentés, les kéfirs, les légumes fermentés ainsi que plusieurs produits carnés [25, 26].

2.3.1 *CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES*

Les bactéries lactiques sont des cellules, procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles ont comme caractéristiques principales d'être immobiles, asporulées, anaérobies, mais aérotoles, acide tolérantes ainsi qu'à Gram positif. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles [25-27]. Les bactéries lactiques peuvent être regroupées selon leur métabolisme. Celles qui ont un

métabolisme produisant exclusivement de l'acide lactique sont des bactéries homolactiques strictes. Celles dont le produit final est de l'acide lactique et de l'acide acétique sont des bactéries hétérolactiques facultatives. Le dernier groupe comprend les bactéries hétérolactiques qui produisent de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et du CO₂ [24, 25, 27].

2.3.2 CLASSIFICATION

Les recherches taxinomiques et phylogéniques (phylogénétiques) en cours modifient grandement la classification des bactéries lactiques. Les connaissances permettent néanmoins d'inclure dans le groupe des bactéries lactiques les genres suivants : *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Atopobium*, *Enterococcus* et *Carnobacterium* [24, 25, 27]. Certains autres genres sont souvent associés aux bactéries lactiques ; *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Gemella*, *Erysipelothrix* [24, 25].

2.3.3 PHYSIOLOGIE

Les bactéries lactiques sont reconnues pour leur efficacité à métaboliser les hydrates de carbone et pour leur haut niveau de phosphorylation des substrats [24]. Le groupe des bactéries lactiques est aussi reconnu pour son très large spectre de fermentation des sucres et d'autres composés. Les voies métaboliques de fermentation des sucres ont généralement comme produit final l'acide lactique qui représente plus de 50 % du carbone assimilé [24, 25].

La fermentation des monosaccharides est réalisée selon deux voies majeures, la fermentation homolactique et la fermentation hétérolactique. Pour ce qui est des disaccharides, comme le lactose, ils entrent dans la cellule après hydrolyse ou sous formes phosphorylés, en fonction du mode de transport. Dans le premier cas, la fermentation des disaccharides est réalisée après leur hydrolyse en monosaccharides qui entrent par la suite dans une des deux voies métaboliques mentionnées précédemment.

Dans le deuxième cas, un système de phosphotransférase est impliqué dans le transport des disaccharides. Lorsque les phosphates de disaccharides sont entrés dans la cellule, ils sont séparés par des glycosyles hydrolases spécifiques en un monosaccharide libre et un monosaccharide phosphorylé [24, 25].

2.3.4 CINÉTIQUE DE CROISSANCE ET DE FERMENTATION

L'étude de la cinétique d'une fermentation en discontinue permet de distinguer six phases de croissance cellulaire : une phase de latence, une phase d'accélération, une phase de croissance exponentielle, une phase de ralentissement, une phase stationnaire et une phase de déclin [25]. À chacune de ces phases correspond un état physiologique qui se reflète sur le taux de croissance cellulaire. Le suivi des différentes phases peut être réalisé en étudiant la population bactérienne en fonction du temps. Les études de cinétique de fermentation et les principaux modèles mathématiques développés se concentrent principalement au niveau de la phase de croissance exponentielle.

L'étude des facteurs qui influencent la cinétique de fermentation des bactéries lactiques permet d'obtenir des informations tant sur la physiologie des microorganismes que sur les conditions optimales de culture. Parmi les facteurs, la température, le pH, les concentrations en substrats et en produits sont ceux qui influencent le plus la phase de croissance exponentielle. Les caractéristiques de l'inoculum, l'activité de l'eau, l'osmolarité, les concentrations en oxygène dissous et en substance inhibitrice du milieu sont aussi des conditions à considérer lors des études de cinétique de fermentation [25, 27].

2.3.5 LACTOBACILLUS

Le genre *Lactobacillus* est celui regroupant le plus d'espèces de bactéries lactiques et est aussi le genre le plus hétérogène englobant un large spectre de phénotypes, de propriétés physiologiques et biochimiques [24, 27]. Le genre est divisé en trois groupes selon des caractéristiques physiologiques (A, B, C) de plus un suffixe (a, b, c) est aussi attribué aux espèces relativement à leur appartenance à certains

regroupements phylogénétiques. Cependant, cette classification n'est pas en accord avec les relations naturelles mises à jour par les analyses phylogénétiques [24, 25].

Les principales caractéristiques des lactobacilles sont d'être : Gram positif, catalase négative, en forme de bâtonnets ou coccobacilles isolés ou en chaîne quelques fois très longue, immobiles, asporogènes, anaérobies facultatives ou microaérophiles, inapte à réduire les nitrates et à hydrolyser la gélatine [24, 25, 27]. Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles sont les plus tolérants à l'acide avec un pH optimal de croissance de 5,5 à 6,2. Ils ont des exigences complexes et variables entre les espèces et ont un large spectre pour la température de croissance (2 à 53 °C) [24, 25, 27].

Les lactobacilles sont retrouvés dans des habitats très variés et ils sont rarement pathogènes [25, 27]. Ils font entre autres, partie de la flore normale du corps humain au niveau de tout le système digestif et du vagin. Le genre *Lactobacillus* est indispensable aux industries alimentaires et laitières pour la production d'aliments fermentés (choucroute, marinades, ensilage) de boissons (bière, vin, jus) de levains, de fromages, de yaourt, de saucisses, etc [25, 27].

2.4 Exopolysaccharides (EPS)

Les polysaccharides sont des polymères de résidus monosaccharidiques [13, 28]. Ils sont classés en homopolysaccharides qui sont constitués d'un seul type de résidus monosaccharidiques et en hétéropolysaccharides qui contiennent plus d'un type de résidus monosaccharidiques. Les polysaccharides sont formés sans matrice par addition successive de résidus saccharidiques. La longueur et la composition varient d'une molécule à l'autre dans une population de molécules semblables [13, 25].

Les polysaccharides sont aussi classés selon l'endroit où ils sont synthétisés dans la cellule. Certains sont synthétisés dans le cytosol où ils servent de source de carbone et d'énergie, d'autres sont les constituants de la paroi cellulaire comme les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Le dernier groupe se présente sous la forme d'une capsule enrobant la bactérie ou sécrété dans le milieu. Il arrive que les deux formes soient

produites simultanément par une bactérie et la nomenclature ne fait pas de différence entre elles. Le terme le plus approprié pour désigner ce groupe de polymères est polysaccharide exocellulaire ou exopolysaccharide (EPS) [13, 20, 25, 29].

2.4.1 EXOPOLYSACCHARIDES PRODUITS PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

Les exopolysaccharides sont produits par plusieurs types de bactéries. La plupart des études portent sur les EPS produits par des bactéries autres que les bactéries lactiques [20]. Les bactéries lactiques, comme plusieurs autres bactéries produisent une grande variété de polysaccharides. Ce n'est que récemment que les recherches se sont intensifiées. Le rôle précis des exopolysaccharides n'est pas clairement défini. On note en outre que les exopolysaccharides ne semblent pas être dégradés ou catabolisés par les organismes producteurs ; ce qui implique qu'ils ne sont pas utilisés comme source d'énergie [25].

2.4.2 MÉCANISMES DE SYNTHÈSE

Les exopolysaccharides sont synthétisés au cours de différentes phases de la croissance et sous diverses conditions qui dépendent de la souche bactérienne [26]. La capacité des bactéries à produire des exopolysaccharides est un caractère extrêmement instable qui pour certaines souches, est associé à un plasmide [25].

Les mécanismes de synthèse des homopolysaccharides diffèrent de ceux impliqués pour la synthèse des hétéropolysaccharides [26]. Les homopolysaccharides comme les dextrans et les α -glucanes du type mutans sont synthétisés à partir de systèmes extracellulaires qui impliquent des enzymes qui sont à la fois sécrétées et membranaires. L'enzyme la mieux connue et impliquée dans cette réaction est une D-glucosyl-transférase, la dextrane-sucrase, qui transfère un groupement glucosyle d'un donneur (saccharose) sur un accepteur approprié (la chaîne de dextrane en élongation) [25].

Les mécanismes de synthèse des EPS sont beaucoup plus complexes. Ils impliquent la membrane cytoplasmique ainsi que des précurseurs intracellulaires [26]. Les précurseurs ou les intermédiaires des exopolysaccharides sont synthétisés dans le cytoplasme et peuvent être excrétés afin d'être assemblés à l'extrémité d'une molécule de polymère préexistante. L'extrusion des sucres nucléotidiques est effectuée par le biais d'intermédiaires lipidiques, d'ester phosphate, d'alcool isoprénoïde à longues chaînes qui ont aussi un rôle au niveau de la fixation des polymères à la membrane [25].

2.4.3 CINÉTIQUE DE PRODUCTION DES EXOPOLYSACCHARIDES

Les exopolysaccharides sont généralement produits dans toutes les conditions de cultures. Les quantités produites sont influencées par les conditions de fermentation et la composition du milieu de culture. La production d'exopolysaccharide nécessite habituellement un substrat intracellulaire. C'est pourquoi tout système qui régule l'absorption du substrat aura une influence sur la synthèse [25].

La plupart des études démontrent que la production de polysaccharide est liée à la croissance bactérienne. Cependant, une étude a montré que la production d'exopolysaccharides par *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40, a lieu même en absence de croissance cellulaire [30]. La relation qui existe entre la croissance bactérienne et la production d'exopolysaccharides est complexe et dépend du flux du carbone intracellulaire vers la glycolyse ou la synthèse de polysaccharide [26].

2.4.4 UTILISATIONS

Les exopolysaccharides ont des possibilités d'utilisations très importantes dans les industries pharmaceutiques et alimentaires ainsi que d'autres industries en raison de leurs propriétés fonctionnelles [27]. Les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques sont principalement utilisés pour améliorer les qualités rhéologiques des produits destinés à l'alimentation [31].

Les exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques peuvent aussi avoir des effets indésirables ou pathogènes, comme la formation de plaque dentaire ou d'endocardites. Dans ces cas, les exopolysaccharides jouent un rôle au niveau de l'attachement des bactéries [25, 32]. Cependant, certains exopolysaccharides produits par des lactobacilles ont montré des propriétés antitumorales [25, 33].

Les EPS sont reconnus en industrie alimentaire pour leurs propriétés fonctionnelles (épaississante, stabilisante, émulsifiante, gélifiante, etc.) [20, 25, 30, 34]. Leurs caractéristiques en font de bons ingrédients dans le domaine pharmaceutique et cosmétique. Les exopolysaccharides trouvent aussi des utilisations dans d'autres domaines industriels (pétrolier, papetier, textile) [25].

2.5 Kéfir et kéfiran

Le kéfir est un lait fermenté acide, légèrement alcoolisé, effervescent, qui a son origine dans les montagnes du sud du Caucase en Russie [25, 35, 36]. Le kéfir est préparé à partir des grains de kéfir qui sont composés d'un consortium de micro-organismes inclus dans une matrice de polysaccharide et de protéine. La microflore des grains de kéfir est composée de bactéries lactiques et de levures en association symbiotique [37] et a été décrite par plusieurs auteurs [35, 37-39]. La microflore des grains de kéfir dépend de leur origine [38] et des procédés de caractérisation [40].

La matrice des grains de kéfir est principalement composée d'un exopolysaccharide appelé kéfiran ainsi que de protéines [41]. Le kéfiran représente 24 % de la matière sèche des grains de kéfir [42]. La structure et les caractéristiques du kéfiran ont été élucidées par La Riviere (1968) et Mukai et *al.* (1988). Il s'agit d'un polysaccharide composé d'unités répétitives d'hexa-heptasaccharide contenant une quantité équimolaire de glucose et de galactose, d'un poids moléculaire de l'ordre de 1×10^6 [35, 43].

Il a été démontré que le kéfiran possède une capacité antitumorale [33, 44, 45]. Dans cette optique, la production de kéfiran a été étudiée à partir de souches pures.

Plusieurs souches productrices de kéfiran ont été isolées à partir des grains de kéfir, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75, *Lactobacillus* sp. KPB-167B, *Lactobacillus* LM-17 [40, 46-48]. Les conditions optimales de culture pour la production de kéfiran ont été déterminées pour la souche KPB-167B. Les conditions les plus favorables sont un pH contrôlé de 5,0, une température de 30 °C dans le milieu défini avec 10 % de lactose et sous atmosphère modifiée (CO₂). Dans ces conditions, un rendement de 2 g/L a été obtenu après 5 jours de fermentation [49].

2.6 Gels alimentaires

Selon Cayot (1998), un gel est défini comme un système polymère-solvant ayant certaines caractéristiques d'un solide dans lequel existe un réseau s'étendant à tout l'espace du produit et constitué de liaisons relativement non destructibles par l'agitation brownienne et par les contraintes mécaniques. La formation d'un gel est un processus complexe où entrent en jeu plusieurs paramètres. Les principaux paramètres sont : la concentration et la nature des polymères ; la concentration et nature des sels ; le pH de la solution ; la vitesse d'acidification ; la température ; les micro-organismes utilisés ; etc. Ces paramètres ont une influence sur les caractéristiques rhéologiques (ex. résistances au cisaillement, à la déformation, viscosité) des gels ainsi que sur leur utilisation [4, 50].

En alimentation et plus particulièrement dans le domaine laitier, la formation de gels est une propriété très importante. Les gels sont obtenus principalement par acidification lactique, emprésurage ou chauffage. La formation d'un gel survient lors de la dénaturation des protéines du lait qui conduit à leur agrégation en réseau qui emprisonne des molécules d'eau [4]. Un bon exemple de gel est le yoghourt qui est obtenu par acidification du lait. Le yoghourt est un réseau constitué de protéines, de bactéries ainsi que d'autres composés, qui emprisonne des molécules d'eau.

En ce qui concerne le lactosérum, ce sont les concentrés ou les isolats des protéines sériques qui sont habituellement utilisés pour la formation de gels. Ces derniers sont généralement obtenus par des traitements d'acidification, des traitements thermiques

ou encore d'homogénéisation à haute pression. Les gels produits ont de bonnes propriétés rhéologiques et fonctionnelles. Ils sont utilisés pour améliorer la texture ou remplacer les gras dans différents types d'aliment (ex. crème glacée, fromage à la crème, vinaigrette, mayonnaise) [50]. Aucune étude n'a été rapportée sur l'utilisation directe du lactosérum sans suppléments pour l'obtention de gels.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Souche bactérienne utilisée

3.1.1 *PROVENANCE DE LA SOUCHE*

La souche ES R2C2 est la propriété de Technologie Biolactis Inc. et a été utilisée tout au long de cette étude.

3.1.2 *CONSERVATION DES SOUCHES*

La lyophilisation de la souche a permis sa conservation à long terme. Trois lots différents de la souche ES R2C2 ont été utilisés durant les travaux. Une ampoule de la souche lyophilisée est inoculée dans 500 mL de milieu RCW (section 3.2.1). L'incubation est réalisée à 30 °C, sans agitation durant 40 heures. Le milieu est ensuite centrifugé durant 15 minutes à 8000g à 24 °C. Le culot est suspendu dans une préparation de lait écrémé stérile 10 % (p/v) contenant 1,3 % (p/v) d'acide ascorbique et 4 % (p/v) de sucre. [51, 52]. La suspension bactérienne est ensuite distribuée en volume de 0,4 mL dans des ampoules de verre stériles pour la lyophilisation. Le contenu des ampoules est congelé dans un mélange de glace sèche et de méthanol (-80 °C). Les ampoules sont lyophilisées puis scellées sous vide. Les ampoules sont identifiées et conservées à 4 °C.

3.2 Milieux de culture

La durée des fermentations a été fixée à 96 heures durant lesquelles 14 prélèvements sont réalisés. L'horaire des prélèvements est présenté dans le tableau 2. Tous les prélèvements ont un volume approximatif de 130 mL, dont 35 mL sont jetés, 5 mL servent à la vérification de la présence de contaminant, 40 mL servent à la production de MPM^{mc}, 18 mL sont congelés à -20 °C, 15 mL servent à la mesure du pH,

Tableau 2. Horaire de prélèvement pour les fermentations

Jour	# Échantillon	Heure	Temps
Jour 1	0	9h00	-1
	1	11h00	1
	2	16h00	6
	3	22h00	12
Jour 2	4	10h00	24
	5	16h00	30
	6	22h00	36
Jour 3	7	10h00	48
	8	16h00	54
	9	22h00	60
Jour 4	10	10h00	72
	11	16h00	78
	12	22h00	84
Jour 5	13	10h00	96

10 mL servent au dénombrement bactérien et finalement, deux tubes de 1,8 mL sont congelés à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour le suivi des monosaccharides, des disaccharides, des sucres totaux et de l'acide lactique. Tous les prélèvements sont effectués stérilement.

3.2.1 *ROGOSA CHEESE WHEY*

Le milieu Rogosa Cheese Whey (RCW) est préparé à partir du milieu Rogosa SL Broth (Difco # 0478-17-4) pour les milieux liquides et à partir du milieu Rogosa Agar (BDH #1.05413) pour les milieux solides. Les milieux sont préparés selon les directives du fabricant à l'exception que l'eau distillée est remplacée par du perméat de lactosérum déprotéiné.

Le perméat de lactosérum déprotéiné est reconstitué à partir de poudre de perméat de lactosérum (Crino, Agropur, Gramby) (62,5 g/L) dissout dans de l'eau distillée. Les protéines sont dénaturées thermiquement par un passage à l'autoclave de 10 minutes à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ et retirées par filtration sur une membrane qualitative Whatman n° 1.

3.2.2 *TSA ET TSA II 5 % SB*

Les géloses de tryptone de soya (TSA)(BBL, cat. no 221185/221283) et de tryptone de soya sheep blood (TSA II 5 % SB)(BBL, cat. no 221239/221261) sont préparés par BBL (Becton Dickinson Microbiology Systems). Ces milieux ont servi à la détection des contaminations dans les précultures et durant les fermentations.

3.2.3 *LACTOSÉRUM*

Les fermentations sont réalisées dans le lactosérum provenant de la fromagerie Boivin de ville de la Baie, Qc, Canada. Le lactosérum est issu de la production de cheddar et est âgé en moyenne de cinq heures, lorsque livré. Le système de production de fromage utilisé par la fromagerie Boivin comporte deux types de rejet de lactosérum ; un premier, après la formation du caillé donne un lactosérum non salé, et un second après le pressage de la pâte qui donne un lactosérum salé. Le lactosérum utilisé est du premier type. Les lots de lactosérum utilisés étaient de composition et de qualité comparable.

3.2.3.1 *Stérilisation*

Aucune technique de stérilisation du lactosérum à petite échelle n'a été trouvée dans la littérature. Les études antérieures réalisées par Technologie Biolactis inc. avec le consortium bactérien utilisaient un lactosérum brut, non stérile. Une technique de stérilisation a donc été développée. Le lactosérum est premièrement filtré par filtration tangentielle sur deux membranes de porosité 0,45 μm (Sartocon, open channel, Hydrosart 0,45 μm , 0,406 m^2 , Sartorius). Cette filtration permet d'enlever les particules de gras, la majorité des bactéries ainsi que les résidus de fromage (caséine). Le lactosérum est par la suite stérilisé par filtration sur une membrane de 0,2 μm (Sartobran P, 0,22 μm , 0,36 m^2 , Sartorius). Finalement, il est distribué stérilement par volume de 7 litres directement dans les cuves de fermentation.

3.3 Conditions de culture

3.3.1 PRÉCULTURES

Les précultures sont préparées à partir des ampoules de la souche lyophilisée. Le contenu d'une ampoule est suspendu dans du milieu RCW et incorporé à 500 mL de milieu RCW. Les précultures sont incubées pendant 40 heures à 30 °C sans agitation.

3.3.2 FERMENTEURS 14L

Les fermentations ont eu lieu dans des fermenteurs d'une capacité de 14L (SF-114 et SF-214, New Brunswick Scientific)(figure 2). Chaque unité de fermentation comprend un système de contrôle d'agitation, un système de contrôle de température et un système de contrôle d'aération. De plus, un système de contrôle de pH, comprenant une sonde à pH relié à un détecteur ainsi qu'une pompe péristaltique, a été ajouté. Le contrôle du pH a été réalisé à l'aide de NaOH 2N. Trois unités de fermentation semblables ont été utilisées.

3.4 Plan d'expérience

Le plan choisi est décrit dans la méthode surface réponse tel que proposé par Box et Draper [53]. Il s'agit d'un plan central composite isovariant par rotation. Le plan comporte 27 essais (nombre minimum d'essai), séparés en trois parties. Les essais 1 à 16 sont des points factoriels et servent à déterminer les effets principaux et les interactions du premier degré entre les variables explicatives. Les expérimentations 17 à 24 sont celles qui permettent l'estimation des effets quadratiques. Les expérimentations 25 à 27 sont des répétitions du point central et permettent d'estimer l'erreur expérimentale. Deux essais supplémentaires ont été ajoutés pour la validation du modèle. L'utilisation de la méthode surface réponse implique la définition des intervalles de variation des variables explicatives étudiées ainsi que de leur encodage.



Figure 2. Photographie numérique d'une unité de fermentation SF-214.

Les variables explicatives choisies sont la température ($^{\circ}\text{C}$), le pH, l'agitation (rpm) et le ratio d'inoculation (%). Ce dernier est calculé par rapport à une préculture de concentration bactérienne de 1×10^8 bactéries/mL (bactéries/mL). Pour chaque facteur, trois niveaux de variation équidistants ont été déterminés et codés selon les valeurs suivantes : -1, 0 et 1. Deux niveaux de variation extrêmes ($-\alpha$ et $+\alpha$) ont été déterminés (Équation I).

Équation I. $\alpha = (N)^{1/4}$

Où N est le nombre de points factoriels.

Le tableau 3 présente la valeur des codes pour les différentes variables explicatives. Les différents essais sont définis dans une matrice de conception pour les valeurs codées et dans une matrice de travail pour les valeurs réelles. Le tableau 4 présente les deux matrices.

Tableau 3. Définition des intervalles des codes de niveaux pour les différentes variables explicatives.

Niveaux	Température (°C)	pH	Agitation (rpm)	Ratio d'inoculation (%)
$-\alpha$	29	4,6	0	0,3
-1	34	5,0	50	4,0
0	39	5,5	100	7,8
+1	44	5,9	150	11,5
$+\alpha$	49	6,4	200	15,3

Tableau 4. Définition des différents essais par rapport aux codes de niveaux et aux valeurs expérimentales.

Essais	Matrice de conception				Matrice de travail			
	Température	pH	Agitation	Ratio	Température (°C)	pH (unité)	Agitation (rpm)	Ratio (%)
1	-1	-1	-1	-1	34	5,0	50	4,0
2	1	-1	-1	-1	44	5,0	50	4,0
3	-1	1	-1	-1	34	5,9	50	4,0
4	1		-1	-1	44	5,9	50	4,0
5	-1	-1	1	-1	34	5,0	150	4,0
6	1	-1	1	-1	44	5,0	150	4,0
7	-1	1	1	-1	34	5,9	150	4,0
8	1	1	1	-1	44	5,9	150	4,0
9	-1	-1	-1	1	34	5,0	50	11,5
10	1	-1	-1	1	44	5,0	50	11,5
11	-1	1	-1	1	34	5,9	50	11,5
12	1	1	-1	1	44	5,9	50	11,5
13	-1	-1	1	1	34	5,0	150	11,5
14	1	-1	1	1	44	5,0	150	11,5
15	-1	1	1	1	34	5,9	150	11,5
16	1	1	1	1	44	5,9	150	11,5
17	- α	0	0	0	29	5,5	100	7,8
18	+ α	0	0	0	49	5,5	100	7,8
19	0	- α	0	0	39	4,6	100	7,8
20	0	+ α	0	0	39	6,4	100	7,8
21	0	0	- α	0	39	5,5	0	7,8
22	0	0	+ α	0	39	5,5	200	7,8
23	0	0	0	- α	39	5,5	100	0,3
24	0	0	0	+ α	39	5,5	100	15,3
25	0	0	0	0	39	5,5	100	7,8
26	0	0	0	0	39	5,5	100	7,8
27	0	0	0	0	39	5,5	100	7,8
28	-1	1	- α	+ α	34	5,9	0	15,3
29	1	+ α	1	0	44	6,4	150	7,8

3.4.1 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées afin de décrire le comportement de la souche ES R2C2 en fonction des variables explicatives définies dans le plan d'expérience. Un ensemble de logiciels SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA) a été utilisé pour effectuer les analyses de corrélation entre les variables explicatives et le modèle du second degré suivant.

$$\text{Équation II. } Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i \chi_i + \sum_i \beta_i \chi_i^2 + \sum_{i < j} \beta_i \beta_j \chi_i \chi_j$$

Où Y représente la réponse du système qui est la variable dépendante (Croissance bactérienne, concentration d'acide lactique, concentration en monosaccharides, concentration en disaccharides, concentration en sucres totaux, % solides totaux, % de cendres, production de MPM^{mc}), les indices i et j varient de 1 au nombre de variables explicatives (4), β_i et β_j sont les coefficients de régression du modèle, χ_i et χ_j sont les variables explicatives en valeurs codées (température, pH, agitation, ratio d'inoculation).

Les études de corrélation ont été conduites selon la méthode « pas à pas » avec les niveaux de tolérances suivants : $p \leq 0,05$, $p \leq 0,10$ et $p \leq 0,15$; où p le niveau de confiance. Les coefficients avec un indice de probabilité inférieur à la limite fixée n'ont pas été inclus dans les modèles finaux. Les prélèvements 2, 5, 8 et 11 n'ont pas été utilisés dans les calculs. L'utilisation de ces modèles permet une estimation des effets linéaires et quadratiques ainsi que des interactions du premier degré des variables explicatives sur les variables dépendantes choisies.

3.5 Méthodes analytiques

3.5.1 SUIVI DE LA CONCENTRATION EN ACIDE LACTIQUE

Le suivi de l'acide lactique dans les fermentations est basé sur la méthode établie par Marsili et *al* [54]. Cette méthode a été développée pour l'analyse quantitative des acides organiques dans les produits laitiers. Le principe de la méthode consiste à

précipiter les protéines et autres contaminants à l'aide d'acétonitrile, puis à séparer et doser les acides organiques restés en solution par HPLC. La quantification est réalisée à partir d'une courbe standard et d'un standard interne.

Les analyses sont effectuées sur les échantillons de 1,8 mL prélevés durant les fermentations et conservés à -20 °C. L'échantillon de 1,8 mL est chauffé à 60 °C durant 15 minutes et bien agité (vortex). Par la suite, 0,5 mL d'échantillon sont ajoutés à 4,5 mL d'acétonitrile puis fortement agité. Puis, 1,5 mL de la solution précédente sont centrifugés à 16 000 g durant 5 minutes à température pièce. Finalement, un mélange de 900 µl de surnageant + 100 µl de standard interne est utilisé pour les analyses en HPLC. Une courbe standard est préparée à partir d'une solution d'acide lactique 1M. Selon les dilutions effectuées, les concentrations finales sont de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM et 15 mM. Le standard interne utilisé est l'acide propionique 1 % (v/v). Les calculs de concentration sont effectués par rapport à la réponse du standard interne.

Les analyses par HPLC sont effectuées sur une colonne Aminex HPX87H (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) (7.8 mm X 300 mm) chauffée à 60 °C et équilibrée dans une solution d'acide sulfurique 18 mM avec un débit linéaire de 18,8 cm/h. L'échantillon de 100 µl selon le même débit. La détection est effectuée en ultraviolet à une longueur d'onde de 220 nm. Toutes les analyses ont une durée de 27 minutes. Le système de chromatographie utilisé est constitué : d'une pompe Waters modèle 510, d'un échantillonneur automatique Spectra-Physics SP8880 muni d'une boucle d'injection de 100 µl et d'un système de réfrigération Spectra-Physics SP8760, d'un chauffe colonne Waters TCM, d'un détecteur à absorbance variable Waters, modèle 484 et un module d'acquisition de données Waters, modèle 740.

3.5.2 SUIVI DES MONOSACCHARIDES ET DISACCHARIDES

Le suivi de la concentration en lactose, en glucose et en galactose est réalisé par HPLC. Les calculs de concentration sont effectués à partir de courbes standard et d'un standard interne.

Les échantillons sont préparés à partir des 1,8 mL prélevés lors des fermentations. L'échantillon de 1,8 mL est chauffé à 60 °C durant 15 minutes et bien agité (vortex) puis centrifugé à 16 000 g durant 5 min à température pièce. Une dilution de 1/100 est effectuée (10 µL de surnageant et 990 µL d'eau milli Q). Pour les échantillons, 100 µL de la dilution précédente sont ajoutés à 900 µL de standard interne. Pour les standard, 100 µL de la dilution sont ajoutés à 900 µL de standard interne. Une courbe standard est effectuée pour chacun des sucres suivis : lactose, glucose et galactose. Les dilutions finales obtenues pour chacun des standards sont les suivantes : 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM et 400 µM. Le standard interne utilisé est le D (-) arabinose en concentration finale de 100 µM.

Les analyses sont effectuées sur un système HPLC Dionex DX-500 muni d'une colonne CarboPack^{MC} PA-10 (4 x 250 mm)(Dionex) équilibrée dans une solution de 18 mM de NaOH avec un débit linéaire de 119.4 cm/h. Pour les analyses, 100 µL d'échantillon sont injectés selon le même débit. Le programme d'élution est présenté au tableau 5. Un système de détection à ampérométrie pulsive couplé à un ordinateur a été utilisé.

3.5.3 SUIVI DES SUCRES TOTAUX

La détermination de la concentration en sucres totaux est réalisée selon le principe de la méthode de Dubois [55]. La méthode repose sur le principe que les groupements réducteurs des sucres donnent une couleur orange lorsqu'ils sont traités avec du phénol et de l'acide sulfurique concentré. La réaction est sensible, la couleur obtenue est stable et son intensité dépend de la quantité de sucre dans l'échantillon. L'absorbance de l'échantillon est mesurée. La concentration en sucres des échantillons est calculée à l'aide d'une courbe standard de glucose.

Tableau 5. Programme d'injection des solvants en vue de la séparation des sucres.

Temps (min)	% A (eau Milli-Q)	% B (NaOH 200 mM)
0	91	9
15.0	91	9
25.0	0	100
40.0	0	100
40.5	91	9
55.0	91	9

Pour le suivi de la concentration en sucres totaux durant les fermentations tous les échantillons ont été traités en triplicata. Les échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée afin d'obtenir des concentrations en sucres comprises entre 100 et 25 mg/L. Par la suite, deux mL d'échantillon sont ajoutés dans un Erlenmeyer de 125 mL auquel 2 mL de phénol 5 % (v/v) sont ajoutés. La solution est agitée à 80 rpm sur une table agitatrice (Lab-Line modèle n° 1345) durant 30 secondes. Tout en maintenant l'agitation, 10 mL d'acide sulfurique 96 % (p/v) sont ajoutés en plein centre de l'Erlenmeyer. L'agitation est maintenue durant 30 secondes. Par la suite, les échantillons reposent sans agitation pour une période minimum de 30 minutes. L'absorbance est lue à 488nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

3.5.4 DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

La croissance bactérienne a été évaluée par cytométrie en flux. Cette technique a été utilisée pour déterminer la concentration bactérienne dans les précultures ainsi que pour suivre la croissance bactérienne durant les fermentations. La méthode consiste à colorer spécifiquement les bactéries à l'aide d'un fluorochrome, puis à l'aide d'un cytomètre, compter les bactéries colorées dans un volume précis d'échantillon. Les

résultats obtenus au cytomètre sont exprimés en événements par 20 μ L d'échantillon. La préparation des échantillons est simple et rapide.

L'échantillon de culture est centrifugé à 10 000 g, à la température de la pièce durant 15 minutes. Le culot obtenu est suspendu dans 1mL de tampon phosphate (PBS)(annexe 1) contenant 10 mM de sodium pyrophosphate et 0,1 % (p/v) d'azoture de sodium. L'addition de sodium pyrophosphate permet une meilleure séparation des bactéries. Durant les fermentations, les échantillons sont conservés à 4 °C puis lorsque tous les échantillons ont été prélevés, le reste des manipulations est effectué. L'échantillon est centrifugé à 10 000 g durant 5min à la température de la pièce puis le culot est suspendu dans du PBS. Par la suite à 20 μ L de la suspension précédente sont ajoutés 10 μ L de bromure d'éthidium (1mg/mL). Par la suite, le volume est complété à 200 μ l avec du PBS contenant 0,1 % (p/v) d'azoture de sodium et 0,05 % (p/v) de Tween 20. Après un temps d'attente de 15 minutes l'échantillon est dilué dans du PBS. Après quoi, les lectures en cytométrie sont effectuées sur les dilutions 1/100, 1/1000 et 1/10000. Il est important que toutes les solutions utilisées soient filtrées sur membrane de nylon de porosité 0,2 μ m (Whatman n°7402-004).

3.5.5 ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE MPM^{mc}

Le MPM^{mc} est produit à partir du lactosérum fermenté par l'addition de CaCl₂ et l'ajustement du pH à 7,5 (méthode en instance de brevet). L'échantillon est ensuite centrifugé durant 15 minutes à la température de la pièce. Le poids obtenu est mesuré et sert d'évaluation pour le rendement de la fermentation en MPM^{mc} en g/L. Durant les essais, l'évaluation du rendement en MPM^{mc} a été réalisée à partir d'échantillons de 40 mL.

3.5.6 CARACTÉRISATION SOMMAIRE DES MPM^{mc}

Cette méthode permet de déterminer dans un même temps les solides totaux et les cendres sur les échantillons de MPM^{mc}. Les solides totaux sont déterminés par différence

de poids avant et après séchage. Les cendres sont ensuite déterminées par différence de poids avant et après incinération de l'échantillon. Les solides totaux sont le poids de l'échantillon moins l'eau. Les cendres sont définies comme étant le résidu inorganique restant, suite à l'incinération ou l'oxydation complète de l'échantillon.

Pour ce faire, une quantité de MPM^{mc} est pesée précisément dans une cupule d'aluminium préalablement séchée et pesée. L'échantillon est séché à 110 °C durant 12h puis refroidi dans un dessiccateur. Le poids de la cupule et le poids de l'échantillon sec sont mesurés. Pour les cendres, le même échantillon est incinéré à 550 °C durant 12h, puis refroidi dans un dessiccateur. À partir de ces mesures, il est aussi possible de définir le pourcentage d'humidité ainsi que le pourcentage de matière organique à l'aide des équations suivantes :

Équation III. % humidité = $(\text{poids initial} - \text{poids sec}) / \text{poids initial} \times 100$

Équation IV. % matière organique (% de solides totaux - % des cendres)

3.5.7 DÉTECTION DES CONTAMINATIONS

La détection des contaminations dans les précultures et durant les fermentations est effectuée en microscopie ainsi que sur des milieux nutritifs TSA et TSA II SB 5 %. La détection en microscopie et sur les milieux nutritifs est effectuée sur les prélèvements 2, 4, 7, 10 13. Les observations en microscopie sont effectuées à 1000X sans coloration. Les contaminations sont détectées selon les caractères morphologiques des bactéries observées. Si les observations montrent la présence d'une contamination, une confirmation sur milieux nutritifs est requise pour éliminer la fermentation.

Pour la détection sur milieux nutritifs, 200 µl de culture sont inoculés par étalement sur les milieux nutritifs TSA et TSA II SB5 5%. Les milieux sont incubés à 30 °C en aérobie. La présence de contaminant est vérifiée après 24h, 48h et 72h d'incubation. Il n'y a pas ou une très faible de croissance de la souche utilisée sur les milieux TSA et TSA II SB 5 % incubés en aérobie. L'absence de colonies indique que la

fermentation n'est pas contaminée par un lactobacille ou par d'autres cultures microaérophiles du même type que la souche ES R2C2. Dans le cas où le test de contamination est positif, la fermentation est répétée et les résultats des autres analyses ne sont pas considérés.

RÉSULTATS

L'utilisation de la méthodologie proposée a généré un nombre considérable de données expérimentales sur lesquelles des analyses statistiques ont été effectuées. Ces dernières ont généré des tableaux où sont présentés les coefficients de régression des modèles. Ce sont ces modèles qui décrivent l'influence des variables explicatives sur chacune des variables dépendantes étudiées durant les fermentations.

Les analyses statistiques permettent d'intégrer l'ensemble des résultats obtenus à un temps de prélèvement pour une variable dépendante. Elles sont réalisées avec les valeurs codées des variables explicatives. Les résultats sont alors exprimés selon l'équation du modèle du second degré (équation II, section 3.4.1). Une fois développée, l'équation prend la forme suivante :

$$\text{Équation V. } Y = \beta_0 + \beta_1 (\text{Température}) + \beta_2 (\text{pH}) + \beta_3 (\text{agitation}) + \beta_4 (\text{ratio d'inoculation}) + \beta_5 (\text{Température})^2 + \beta_6 (\text{pH})^2 + \beta_7 (\text{agitation})^2 + \beta_8 (\text{ratio d'inoculation})^2 + \beta_9 (\text{Température})(\text{pH}) + \beta_{10} (\text{Température})(\text{agitation}) + \beta_{11} (\text{température})(\text{ratio d'inoculation}) + \beta_{12} (\text{pH})(\text{agitation}) + \beta_{13} (\text{pH})(\text{ratio d'inoculation}) + \beta_{14} (\text{agitation})(\text{ratio d'inoculation}).$$

Cette équation permet de prédire la réponse du système dans les limites fixées pour chacune des variables dépendantes étudiées. Les analyses statistiques permettent de calculer les coefficients de régression (β) ainsi que d'éliminer les variables explicatives dont l'influence n'est pas significative selon le niveau de tolérance. De cette manière, l'équation et les analyses s'en trouvent simplifiées. Par la suite, un calcul simple permet de convertir les valeurs codées en valeurs réelles. Une équation de ce type (équation V) est obtenue pour 10 des 14 prélèvements, pour toutes les variables dépendantes suivies (4 variables).

4.1 Calculs des modèles

Le modèle général utilisé est présenté dans l'équation II. Pour notre étude, il est défini dans l'équation V. Comme mentionné précédemment, les modèles servent à déterminer les valeurs des variables dépendantes (Y) en fonction de la variation des variables explicatives (χ). Dans les modèles, ce sont les coefficients de régression (β_i) qui permettent de déterminer les influences des variables explicatives ainsi que de calculer la valeur des variables dépendantes. Les coefficients de régression sont déterminés par les analyses statistiques « pas à pas ». Les coefficients de régression sont regroupés en tableaux en fonction de la variable dépendante étudiée et séparée en fonction du temps. Seuls les coefficients ayant une valeur significative où $p \leq 0.10$ sont conservés. De plus, les coefficients ayant une valeur de $p \leq 0.05$ sont identifiables par leur caractère gras. Dans le cas où le coefficient est non significatif, la case est laissée vide. Pour tous les temps, un modèle est calculé.

Voici un exemple de calcul de la concentration en acide lactique au temps 48 heures. Comme mentionné précédemment, les calculs sont effectués avec les valeurs codées des variables explicatives. Dans notre exemple les variables explicatives prendront les valeurs suivantes : température : 1 (44 °C) ; pH : -1 (5,0) ; Agitation : -1 (50 rpm) ; ratio d'inoculation 1 (11.5 %). À l'aide des valeurs des coefficients pour la variation de la concentration en acide lactique ainsi qu'en se basant sur l'équation V nous obtenons l'équation suivante (les abréviations des variables explicatives ont été conservées pour faciliter la compréhension) :

$$\text{Concentration en A.lactique} = 32.2 + 3.5x(1)(T^\circ) + -7.3x(-1)(\text{pH}) + 5.9x(1)(\text{Ratio}) + \\ -4.7x(1)^2(T^\circ) + -4.0(1)(-1)(T^\circ \times \text{pH}) = 74.99 \text{ mM}$$

Comparativement à l'équation III, l'équation précédente est beaucoup plus simple puisque ce ne sont pas tous les coefficients qui ont une valeur significative. Ainsi, les coefficients de l'agitation et de la plupart des effets quadratiques et des interactions ne sont pas inclus dans l'équation.

4.1.1 DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

Les valeurs des coefficients de régression pour le suivi du dénombrement bactérien sont présentées au tableau 6. Le dénombrement bactérien permet d'obtenir une évaluation de la croissance bactérienne par l'augmentation du dénombrement de cellules présentes dans le milieu de culture à un temps donné.

Au niveau du dénombrement bactérien, c'est le ratio d'inoculation qui a l'influence la plus marquée. La valeur des coefficients indique que les ratios d'inoculation élevés favorisent une plus grande croissance bactérienne. Cette influence est présente tout au long de la fermentation. Jusqu'à 48 heures, c'est cette variable qui a l'influence la plus élevée. Son influence est en grande partie linéaire, puisqu'il n'y a aucun coefficient quadratique et peu de coefficients d'interaction qui ont une valeur significative. La seconde variable explicative en importance pour la croissance bactérienne est le pH. Les valeurs des coefficients de régression de cette variable nous indiquent que les pH situés sous la valeur centrale du modèle favorisent la croissance bactérienne. Son influence est significative à partir de 36 heures. Cette influence est négative et en grande partie linéaire, car la majorité des coefficients de cette variable sont des coefficients du premier degré.

L'influence de la température et de l'agitation sont les moins constantes dans le temps. L'influence de ces deux variables se fait surtout ressentir entre 12 et 36 heures. Au niveau de la température, seuls des coefficients quadratiques et d'interactions sont ressortis comme significatifs. Généralement, les valeurs de température inférieures à la valeur centrale favorisent une augmentation de la croissance bactérienne. Pour ce qui est de l'agitation, les valeurs situées sous la valeur centrale favorisent une croissance bactérienne plus élevée.

C'est à 24 heures et à 36 heures que le plus de coefficients de régression sont retrouvés. En observant les valeurs de la constante, c'est dans cette période de temps que la croissance bactérienne est la plus marquée.

Tableau 6. Tableau des coefficients de régression des modèles décrivant la croissance bactérienne (bactéries/mL) durant les fermentations. Température (°C), ratio (%), Agitation (rpm).

Temps	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
°C										
pH					-3.0E+07	-6.0E+07	-7.0E+07	-7.0E+07	-8.0E+07	-6.0E+07
rpm				-9.0E+06	-3.0E+07					
%		3.0E+06	8.0E+06	1.0E+07	5.0E+07	6.0E+07	6.0E+07	7.0E+07	6.0E+07	5.0E+07
°C ²				-7.0E+06	-3.0E+07					-4.0E+07
pH ²				-6.0E+06	-3.0E+07					
rpm ²										
% ²										
°C x pH										
°C x rpm			-5.0E+06	-1.0E+07	-4.0E+07					
°C x %				-1.0E+07						
pH x rpm			7.0E+06							
pH x %				1.0E+07						
rpm x %										
Constante		6.0E+06	1.0E+07	4.0E+07	1.0E+08	1.0E+08	2.0E+08	2.0E+08	2.0E+08	2.0E+08

Coefficients en caractères gras : $p \leq 0.05$

Autres coefficients : $p \leq 0.10$

4.1.2 PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Les valeurs des coefficients de régression pour le suivi de la production d'acide lactique sont présentées au tableau 7. La variable explicative ayant le plus d'influence est le pH, suivi de la température et du ratio d'inoculation. Finalement, l'agitation est la variable ayant la plus faible influence. La majorité des coefficients de régression significatifs sont retrouvés après 48 heures de fermentation. De plus, jusqu'à 24 heures, seul le pH exerce une influence significative et peu de coefficients d'interaction significatifs sont observés.

L'influence du pH est croissante et inversement proportionnelle à la production d'acide lactique aux différents temps de prélèvement. C'est-à-dire que lorsque le pH augmente la production d'acide lactique diminue. La présence de coefficient de régression du second degré (pH^2) entre 0 et 24 heures accentue l'influence du pH. Toutefois, à 72 et 84 heures, les coefficients du second degré diminuent son influence. Les coefficients de régression montrent que les valeurs faibles de pH favorisent une plus grande production d'acide lactique dans le milieu de culture par la souche ES R2C2.

Les effets de la variation de la température sur la production d'acide lactique ne sont pas bien définis. Les coefficients à 36 et 48 heures montrent un effet directement proportionnel à la production d'acide lactique. Tandis qu'à 60, 72 et 96 heures l'effet de la température est indéfini, car seuls les coefficients du second degré ($^{\circ}\text{C}^2$) sont significatifs. À 84 heures, c'est le coefficient d'interaction avec l'agitation ($^{\circ}\text{C} \times \text{rpm}$) qui permet de déterminer qu'une diminution de la température amène une augmentation de la production d'acide lactique.

L'influence du ratio d'inoculation est significative à partir de 48 heures. Elle est directement proportionnelle à la production d'acide lactique. Un seul coefficient du second degré ($\% ^2$) est significatif à 72 heures. La présence de ce dernier fait en sorte que c'est la valeur centrale (0) qui permet d'obtenir la production d'acide lactique la plus

élevée. À 72 heures, une augmentation ou une diminution du ratio d'inoculation amène invariablement une diminution de la production d'acide lactique.

La production d'acide lactique est inversement proportionnelle à la variation de l'agitation et n'est significative qu'à partir de 72 heures. Un seul coefficient d'interaction est présent à 72 heures avec la température. La valeur des coefficients indique qu'une valeur d'agitation minimum amène une augmentation significative de la production d'acide lactique à partir de 72 heures.

Les valeurs de la constante montrent que la plus forte augmentation de la production d'acide lactique au point central est observée aux points 36 et 48 heures. L'augmentation observée pour cette période est de 8 mM et de 10 mM.

Tableau 7. Tableau des coefficients de régression des modèles décrivant la production d'acide lactique (mM) durant les fermentations.

Temps	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
°C					3,2	3,5				
pH		-2,2	-3,2	-3,6	-5,6	-7,3	-8,6	-9,3	-8,8	-9,2
rpm								-6,0	-5,9	-6,2
%					3,9	5,9	6,6	5,8	6,1	5,3
°C ²						-4,7	-6,2	-7,7	-5,8	-5,9
pH ²	7,6	5,0	3,6	3,2				-4,7	-4,0	
rpm ²										
% ²								-3,7		
°C x pH						-4,0				
°C x rpm									4,3	
°C x %										
pH x rpm								5,4		
pH x %										
rpm x %										
Constante	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	47,7	38,4	39,4

Coefficients en caractères gras : $p \leq 0.05$ Autres coefficients : $p \leq 0.10$

4.1.3 CONCENTRATION EN LACTOSE

Le lactose est le principal sucre retrouvé dans le lactosérum. La diminution de la concentration en lactose en fonction du temps est un des objectifs du projet. Les valeurs des coefficients de régression décrivant la variation de la concentration en lactose durant les fermentations sont présentées au tableau 8. Les quatre variables explicatives ont une influence durant les fermentations.

Néanmoins, la température est la variable ayant le moins d'influence sur la concentration en lactose puisque seuls des coefficients du second degré sont présents. Étant donné que seuls les coefficients du second degré sont significatifs, l'influence de la température est maximale à la valeur centrale de l'intervalle de variation (0). À toutes les autres valeurs, la diminution de la concentration en lactose est moins importante.

Pour ce qui est du pH, seuls des coefficients du second degré et des coefficients d'interaction sont significatifs. Les coefficients d'interaction sont retrouvés aux temps 0, 12 et 24 heures. À ces temps de prélèvement, la diminution de la concentration en lactose est plus importante lorsque le pH prend une valeur de (-2). Aux autres temps de prélèvement où l'on retrouve des coefficients de régression, c'est à la valeur centrale (0) que la diminution est la plus marquée.

La variation de la concentration en lactose dans le milieu est proportionnelle à la variation de l'agitation. La diminution de la concentration en lactose est maximale lorsque la valeur d'agitation est à -2. Des coefficients d'interaction avec le pH sont présents aux temps 0, 12 et 24 heures. Ces coefficients amènent une diminution plus marquée lorsque les valeurs de pH et d'agitation sont inférieures à la valeur centrale (< 0).

Enfin, La variation de la concentration en lactose est inversement proportionnelle à la variation du ratio d'inoculation. Un ratio d'inoculation élevé amène une diminution de la concentration en lactose. Cependant, à 84 et 96 heures, la présence de coefficients du second degré amène une modification dans l'influence du ratio d'inoculation. À ces deux temps de prélèvement, la valeur où la diminution de la concentration en lactose est

plus importante est la valeur centrale. Des coefficients d'interaction avec le pH sont obtenus au temps 0 et 12 heures. Pour ces deux prélèvements, ce sont les valeurs inférieures à la valeur centrale qui amènent la diminution de la concentration en lactose la plus marquée.

Finalelement, au niveau de la constante, lorsque les variables prennent la valeur centrale, la diminution maximale entre deux prélèvements se situe entre 48 et 60 heures. La diminution est de près de 57 mM ce qui correspond à 37 % de la concentration initiale en lactose. Il est aussi intéressant de noter qu'aux conditions centrales à 96h, la diminution en concentration correspond à 99 % de la concentration initiale en lactose.

Tableau 8. Tableau des coefficients de régression des modèles décrivant la variation de la concentration en lactose (mM) durant les fermentations.

Temps	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
°C										
pH										
rpm			6,2		12,1	13,1		13,7	14,8	16,4
%										
°C ²				-8,9	-14,8	-22,4	-26,7	-27,8	-28,1	-26,4
pH ²	-8,3	-10,8					18,4	24,3	28,7	29,3
rpm ²			-12,6	-10,6			15,6	19,5	23,1	21,3
% ²			-14,6		-8,3					
°C x pH			-11,8		-13,3				13,8	13,9
°C x rpm										
°C x %										
pH x rpm	-8,9		-9,3	-11,0						
pH x %	9,1		8,2							
rpm x %										
Constante	152,4	154,2	192,7	145,1	139,6	104,2	47,6	31,1	5,4	1,5

Coefficients en caractères gras : $p \leq 0.05$

Autres coefficients : $p \leq 0.10$

4.1.4 PRODUCTION DE MPM^{mc}

Le MPM^{mc} est une matrice protéique malléable obtenue à partir de la fermentation du lactosérum par la souche ES R2C2. Cette matrice protéique peut être obtenue à tous les temps de fermentation. La production de MPM^{mc} est caractérisée par une diminution de la quantité produite en fonction du temps. Cette diminution est accompagnée par l'amélioration de certaines propriétés de la matrice qui résulte en partie de la modification des protéines qui la compose (travaux en cours). Les résultats attendus et recherchés sont donc une diminution de la production de MPM^{mc} en fonction du temps. Le tableau 9 montre les valeurs des coefficients de régression décrivant la production de MPM^{mc} en fonction du temps. Il est possible d'observer que les variables explicatives étudiées ont peu d'influence sur la production de MPM^{mc}.

Toutefois, le ratio d'inoculation est la variable explicative ayant le plus d'influence sur la production de MPM^{mc}. Les valeurs des coefficients montrent que la production de MPM^{mc} diminue de manière plus prononcée à un ratio d'inoculation de +2. Aux prélèvements 1 et 12 heures, des coefficients d'interaction significatifs avec le pH sont présents. Cependant, étant donné qu'à ces temps, seuls des coefficients du second degré pour le pH sont significatifs, il est impossible de déterminer les valeurs auxquelles la diminution de production serait la plus marquée.

La température, le pH et l'agitation ont aussi une influence sur la production de MPM^{mc}. Mais étant donné que seuls des coefficients de second degré ou d'interactions sont significatifs, il est difficile de déterminer le type d'influence des variables.

Tableau 9. Tableau des coefficients de régression des modèles décrivant la production de MPM^{mc} (g/L) durant les fermentations.

Temps	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
°C					-3,30					
pH										
rpm										
%				-2,02	-3,76	-3,31	-3,50	-4,45	-3,71	
°C ²						3,31	4,39	2,75		5,44
pH ²		-2,93	-2,73	-2,57						
rpm ²										
% ²										
°C x pH										
°C x rpm										
°C x %										
pH x rpm			-3,78	-2,88	-4,16					
pH x %		4,32	2,69							
rpm x %										
Constante		59,59	56,90	55,04	49,52	43,31	42,89	42,46	46,46	40,85

Coefficients en caractères gras : p ≤ 0.05

Autres coefficients : p ≤ 0.10

4.2 Effets spécifiques aux variables explicatives

Dans cette section, les effets de la variation d'une variable explicative (température, pH, etc.) sur les différentes variables dépendantes (croissance bactérienne, etc.) est étudié. Il suffit de faire varier la valeur codée de la variable explicative entre -2 et 2 dans l'équation correspondante et de fixer celles des autres variables explicatives à 0 . Il est ainsi possible d'obtenir une évaluation des effets de la variable explicative sélectionnée à chacun des temps d'échantillonnage. Il est important de spécifier qu'une équation n'est valable que pour le temps correspondant. De sorte qu'au point de vue des statistiques, les différents temps ne peuvent être reliés entre eux pour former une courbe. Cependant, pour augmenter le degré de compréhension les points sont reliés, de plus, les valeurs des variables explicatives sont exprimées en valeurs réelles. De plus afin d'obtenir une meilleure image des effets des variables explicatives, les calculs ont été réalisés avec deux points supplémentaires pour chacune des variables explicatives. Par exemple, au niveau de la température, en plus des cinq température présentes dans le plan d'expérience, les calculs ont été réalisés pour des températures de 37°C et 42°C .

4.2.1 TEMPÉRATURE

La température a une influence positive sur la croissance bactérienne, la production d'acide lactique et l'utilisation du lactose. La figure 3 présente l'influence de la température sur la fermentation du lactosérum par la souche ES R2C2. La température de 39°C est celle où les meilleurs résultats sont observés. L'influence est visible en moyenne à partir de 36 heures.

Le panneau A présente l'influence de la température sur la croissance bactérienne. L'influence de la température n'est observée qu'aux temps 24, 36 et 96 heures. À 24 heures, la croissance bactérienne est maximale entre 37°C et 42°C alors qu'aux deux autres prélèvements c'est à 39°C que la croissance bactérienne est maximale. Il est aussi possible d'observer la phase de croissance exponentielle s'étendant jusqu'à 40 heures

suivie du plateau. Le dénombrement maximal calculé en fin de croissance exponentielle est de $1,44 \times 10^8$ bactéries/mL.

Le panneau B présente l'influence de la température sur la production de MPM^{mc} aux différents temps de prélèvements. La production de MPM^{mc} diminue en fonction du temps aux températures près de la valeur centrale. La période comprise entre 24 et 48 heures est celle où la plus forte diminution de production est observée. La production diminue de près de 12 g/L. À 36 heures c'est à 44 °C que la production est la plus basse. Par la suite, c'est à 39 °C que la plus faible production est enregistrée. Dans le cas des températures extrêmes, à 29 °C la production ne diminue pas sous 54 g/L. Alors qu'à 49 °C, la production oscille entre la plus faible et la plus forte diminution.

Le panneau C présente l'influence de la température sur la production d'acide lactique aux différents temps de prélèvement. Il est possible d'observer la phase de latence qui s'étend jusqu'à 24 heures. À 36 heures, la production d'acide lactique est maximale à 49 °C. Cependant, aux autres temps de prélèvement la concentration est maximale entre 37 et 42 °C puis à 39 °C. La phase de croissance exponentielle est située entre 24 et 60 heures suivies de la phase plateau.

Le panneau D présente l'influence de la température sur la concentration en lactose aux différents temps de prélèvement. Il est intéressant de noter qu'aux valeurs extrêmes la concentration en lactose diminue peu et de manière pratiquement linéaire. C'est à la valeur centrale que la diminution de la concentration en lactose est la plus prononcée. Cependant, les démarcations entre les différentes températures n'apparaissent qu'à partir de 60 heures. La période où la plus forte diminution est observée se situe entre 36 et 60 heures.

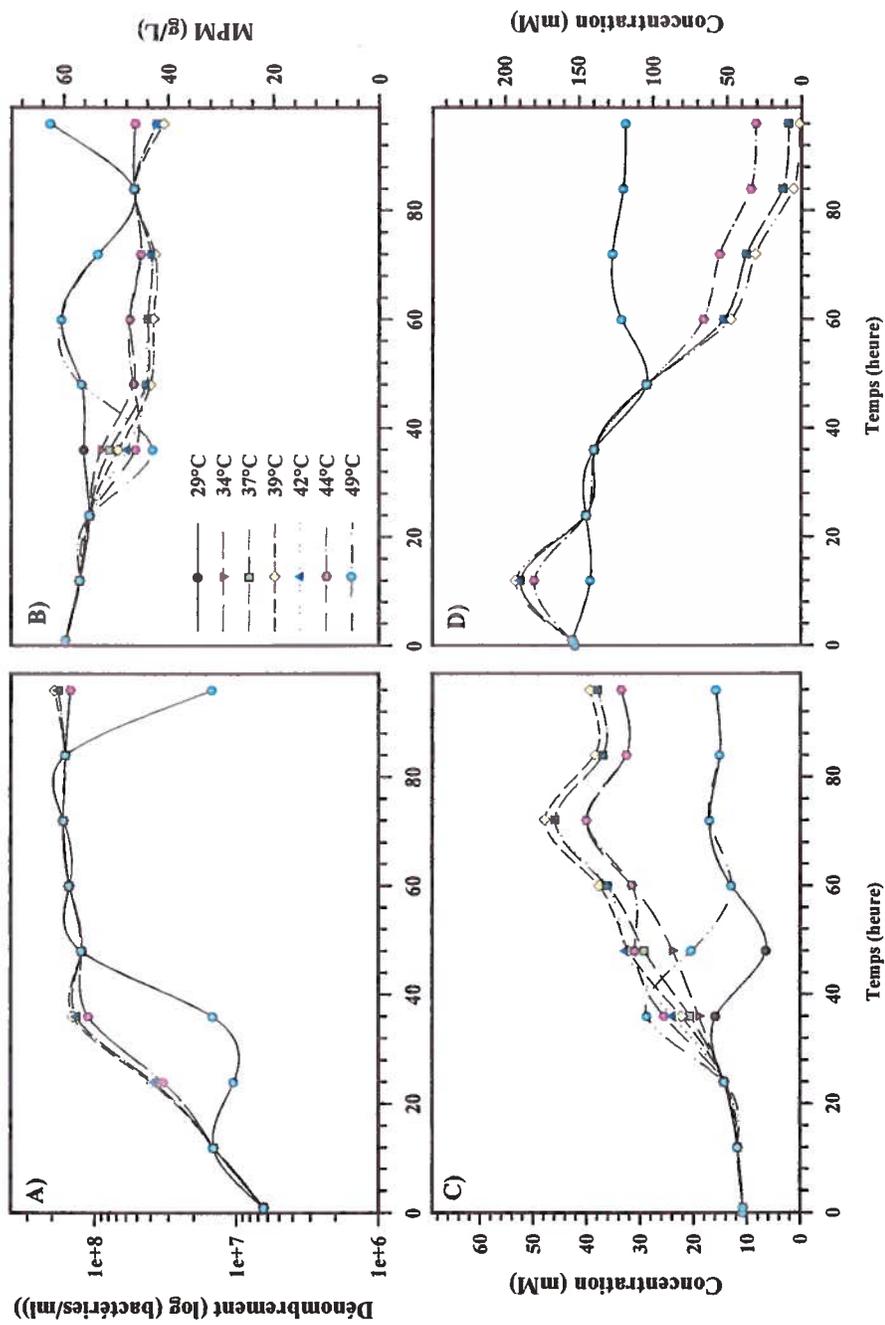


Figure 3. Influence de la température sur quatre des variables dépendantes étudiées : Panneau A croissance bactérienne, B production de MPM^{mc}, C production d'acide lactique, D utilisation du lactose.

4.2.2 PH

L'influence propre au pH sur les variables dépendantes est présentée à la figure 4. Les effets les plus marqués du pH sont observés au niveau du dénombrement bactérien ainsi qu'au niveau du suivi de la production d'acide lactique (panneau A et C). La meilleure croissance bactérienne est observée à pH 5 à partir de 36 heures de fermentation, alors que les pH inférieurs à 5,5 semblent favoriser la production d'acide lactique. Les effets du pH sur la concentration en lactose et sur la production de MPM^{mc} (panneau D et B), sont moins marqués. Pour ces derniers, le pH optimal observé est de 5,5.

Le panneau A présente l'influence du pH sur la croissance bactérienne aux différents temps de prélèvements. L'influence du pH est observée à partir de 24 heures où seules les valeurs extrêmes ne favorisent pas la croissance bactérienne. Par la suite, à 36 heures, la croissance maximale est obtenue avec un pH de 5,2. Pour les prélèvements suivants, c'est à pH 4,6 que le maximum est atteint. C'est entre 24 et 40 heures que la plus forte hausse du nombre de bactéries est observée. À la fin de cette période la croissance bactérienne atteint 2.9×10^8 bactéries/mL. Le dénombrement le plus faible pour tous les temps de prélèvements est observé à pH 6,4.

Le panneau B présente l'influence du pH sur la production de MPM^{mc} aux différents temps de prélèvements. Le pH n'exerce une influence sur la production de MPM^{mc} que durant les 24 premières heures. Par la suite, le pH n'a aucune influence significative. La diminution de la production est plus accentuée près de la valeur centrale.

Le panneau C présente l'influence du pH sur la concentration en acide lactique aux différents temps de prélèvements. La variation du pH a de l'influence à chacun des temps de prélèvements. Aux valeurs extrêmes, l'influence exercée par le pH ne suit pas la tendance observée aux autres valeurs. La tendance générale montre que la concentration d'acide lactique est supérieure lorsque le pH des fermentations est contrôlé à 5,0. Cependant, aux temps 36 40 60 et 96 heures c'est à un pH de 4,6 qui est une valeur

extrême, que la concentration obtenue est maximale. La plus forte augmentation de la concentration en acide lactique est observée entre 36 et 72 heures. À la fin de cette période, la concentration obtenue est de 52 mM.

Le panneau D présente l'influence du pH sur la concentration en lactose aux différents temps de prélèvements. L'influence du pH jusqu'à 40 heures est positive mais s'inverse à partir de 60 heures. Dans la première partie, la concentration en lactose est plus élevée aux pH situés près de la valeur centrale. Alors que dans la seconde partie, aux mêmes valeurs correspond les concentrations en lactose les moins élevées. Quant aux valeurs extrêmes, la concentration en lactose est pratiquement stable pour tous les prélèvements. La période de plus forte diminution se situe entre 36 et 40 heures. La diminution observée est de 92 mM.

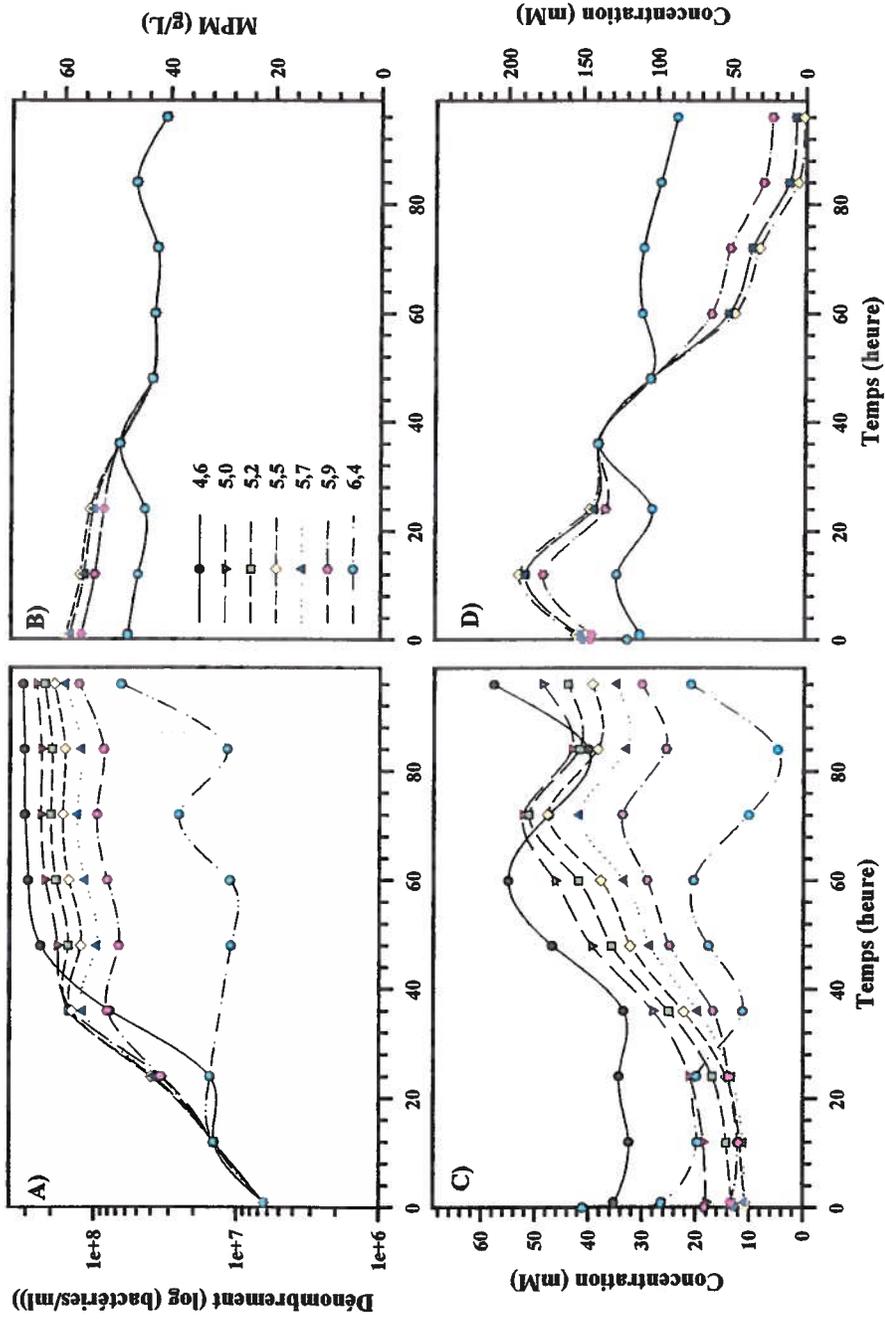


Figure 4. Influence du pH sur quatre des variables dépendantes étudiées : Panneau A croissance bactérienne, B production de MPM^{mc}, C production d'acide lactique, D utilisation du lactose.

4.2.3 AGITATION

La figure 5 présente les effets de la variation de la vitesse d'agitation sur les différentes variables dépendantes étudiées. De manière générale, l'agitation n'a pas d'influence marquée sur les variables dépendantes suivies. Aucune influence n'est observée pour la production de MPM^{mc}. L'influence la plus marquée est observée pour la concentration en lactose (panneau D). Les observations montrent que le niveau d'agitation minimum correspond aux meilleurs résultats pour toutes les variables dépendantes étudiées.

Le panneau A présente l'influence de la vitesse d'agitation sur la croissance bactérienne aux différents temps de prélèvements. L'influence de l'agitation n'est présente qu'aux temps 24 et 36 heures. Le dénombrement maximal est obtenu lorsque l'agitation est au minimum. Il est possible d'observer que la phase de croissance s'étend jusqu'à 36 heures suivie par une phase plateau. Le dénombrement maximum observé est de 2×10^8 bactéries/mL à 36 heures.

Le panneau B présente l'influence de l'agitation sur la production de MPM^{mc} aux différents temps de prélèvements. L'agitation n'exerce aucune influence significative sur la production de MPM^{mc}.

Le panneau C présente l'influence de la vitesse d'agitation sur la concentration en acide lactique aux différents temps de prélèvements. Ce n'est qu'à partir de 72 heures que l'influence de l'agitation est significative. Les concentrations maximales d'acide lactique sont atteintes lorsque l'agitation est nulle.

Le panneau D présente l'influence de l'agitation sur la concentration en lactose aux différents temps de prélèvements. L'agitation exerce une influence à partir de 12 heures jusqu'à 96 heures sauf aux points 24 et 36 heures. De 48 à 96 heures, il est possible d'affirmer que la diminution de la concentration en lactose est proportionnelle à la vitesse d'agitation. Cependant à 12 et 36 heures la relation entre l'agitation et la concentration en lactose est moins bien définie.

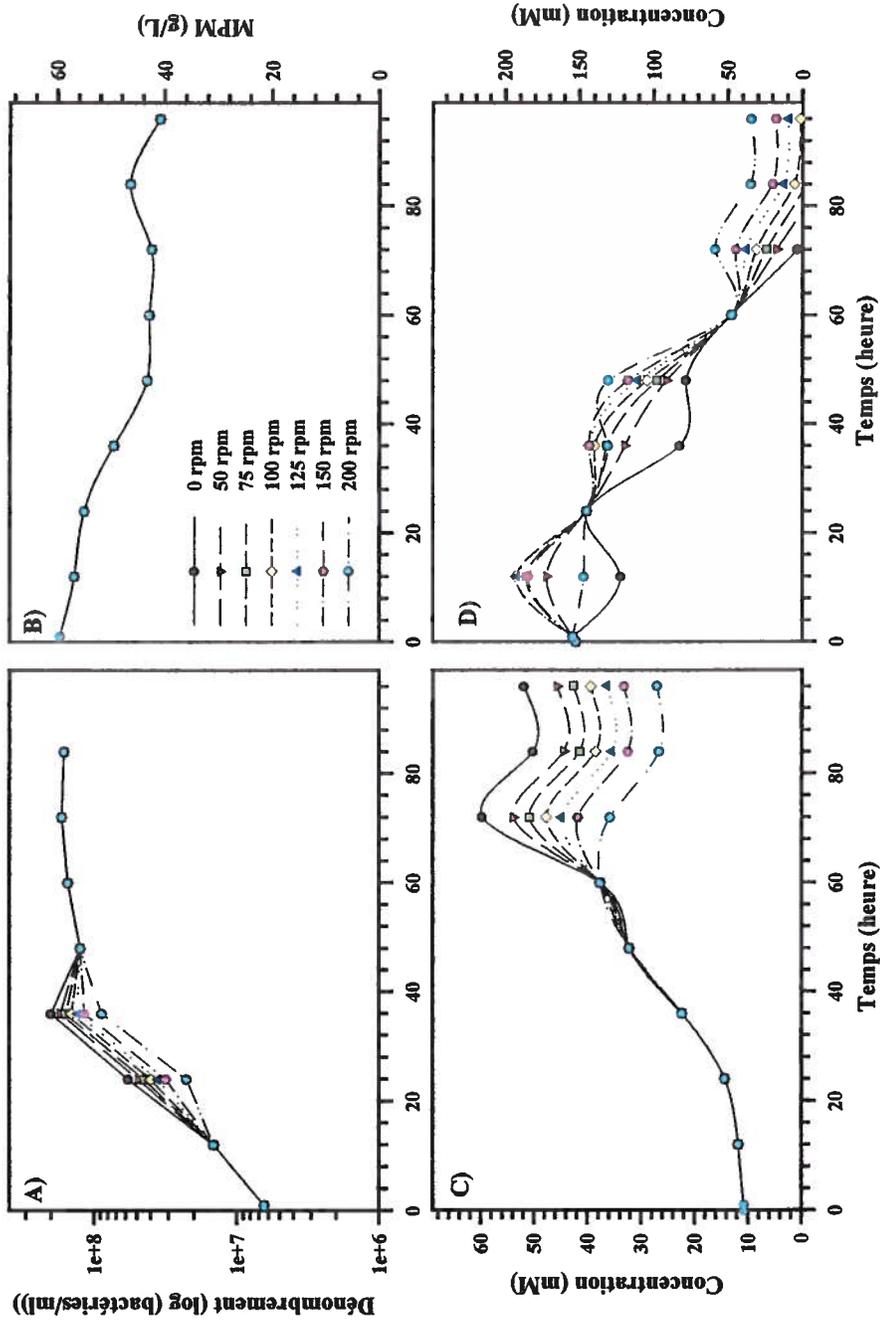


Figure 5. Influence de l'agitation sur quatre des variables dépendantes étudiées : Panneau A croissance bactérienne, B production de MPM^{mc}, C production d'acide lactique, D utilisation du lactose.

4.2.4 *RATIO D'INOCULATION*

La figure 6 présente l'influence du ratio d'inoculation sur les variables dépendantes suivies. En prenant une vue d'ensemble, il est possible d'affirmer que le ratio d'inoculation a une influence marquée sur la majorité des variables dépendantes suivies. Un fort ratio d'inoculation a une influence positive sur la production d'acide lactique, la croissance bactérienne, l'utilisation du lactose. L'influence est négative pour la production de MPM^{mc}. Généralement, c'est avec un ratio d'inoculation de 15,3 % que les meilleurs résultats sont observés.

Le panneau A présente l'influence du ratio d'inoculation sur la croissance bactérienne aux différents temps de prélèvement. Pour tous les prélèvements, la croissance bactérienne est proportionnelle au ratio d'inoculation. C'est entre 24 et 36 heures que la plus forte augmentation entre deux prélèvements est observée. Pour le ratio d'inoculation de 15,3 % cette augmentation est de près de $1,8 \times 10^8$ bactéries/mL. Le dénombrement maximum calculé est de 3×10^8 bactéries/mL à 72 heures.

Le panneau B présente l'influence du ratio d'inoculation sur la production de MPM^{mc} aux différents prélèvements. Il n'y a que pour les prélèvements de 0, 1, 12 et 96 heures que le ratio d'inoculation n'a aucune influence. Pour tous les autres prélèvements, la production de MPM^{mc} est inversement proportionnelle au ratio d'inoculation. La production diminue jusqu'à 48 heures puis se stabilise à près de 35 g/L.

Le panneau C présente l'influence du ratio d'inoculation sur la concentration en acide lactique aux différents prélèvements. L'influence se fait ressentir à partir de 36 heures jusqu'à la fin des fermentations. Durant cette période, la variation de la production d'acide lactique est proportionnelle au ratio d'inoculation sauf pour le prélèvement à 72 heures. La plus forte augmentation de la concentration en acide lactique se situe entre 24 et 60 heures. Durant cette période, la concentration augmente de près de 36 mM ce qui correspond à 72 %.

Le panneau D présente l'influence du ratio d'inoculation sur la concentration en lactose aux différents prélèvements. Pour les prélèvements 24, 48, 60 et 72 heures la concentration en lactose est inversement proportionnelle au ratio d'inoculation. Pour les autres prélèvements, la relation entre les deux variables répond à d'autres règles. Cependant dans la majorité des cas c'est au ratio d'inoculation de 15,3 % que la concentration en lactose atteint sa valeur la plus basse.

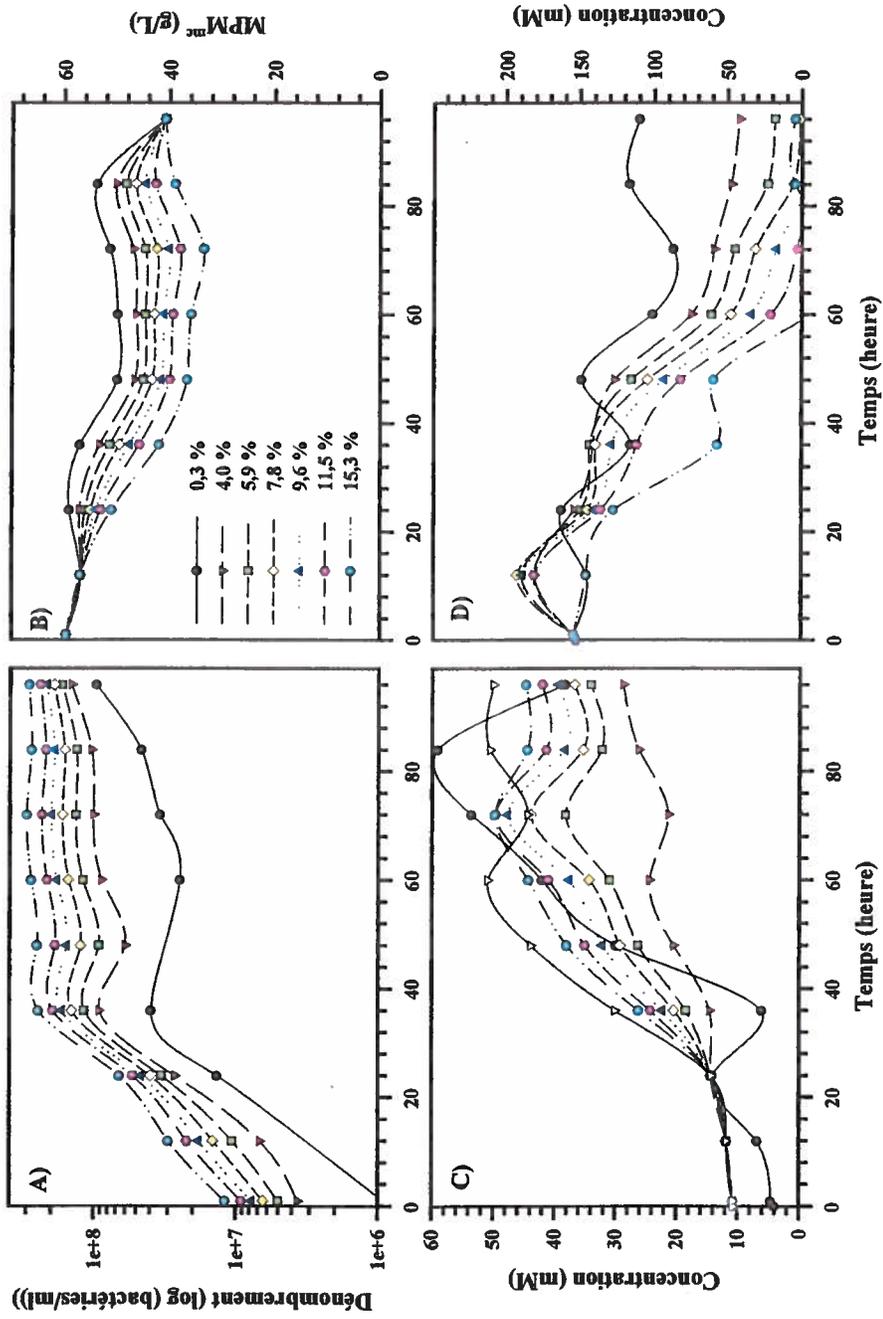


Figure 6. Influence du ratio d'inoculation sur quatre des variables dépendantes étudiées : Panneau A croissance bactérienne, B production de MPM^{mc}, C production d'acide lactique, D utilisation du lactose.

4.3 Interactions du premier degré

Les interactions du premier degré sont les effets combinés de deux variables explicatives lorsque les autres variables explicatives prennent une valeur fixe. Cette étude est réalisée en faisant varier les valeurs codées de -2 à 2 des variables explicatives voulues tout en maintenant les autres variables explicatives à 0 dans les équations correspondantes. Les résultats sont exprimés en courbes de surfaces dans des figures en trois dimensions pour chacun des temps de prélèvements. Il est ainsi possible d'observer la variation des effets combinés en fonction du temps lorsque les différents graphiques de surface sont comparés.

Comme présenté dans les tableaux des coefficients de régression, il n'existe pas d'interaction entre toutes les variables explicatives étudiées à tous les temps d'échantillonnage. Les coefficients d'interactions significatifs ne sont obtenus que lorsque les relations entre deux variables explicatives sont significatives. Seules les figures où des coefficients interactions ressortent sont commentées. Cependant, toutes les figures sont présentées dans les annexes correspondantes.

4.3.1 DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

Au niveau du dénombrement bactérien, il est possible de constater que des interactions sont présentes entre la température et le pH, la température et le ratio d'inoculation, le pH et l'agitation et finalement entre le pH et le ratio d'inoculation (tableau 6). Cependant, ces interactions sont pour la plupart ponctuelles et présentes pour un seul temps d'échantillonnage.

L'annexe 2 regroupe les figures illustrant les relations entre les différentes variables explicatives pour le dénombrement bactérien. L'annexe 2a présente les interactions du premier degré entre la température et le pH. Ces interactions sont présentes aux prélèvements de 12, 24 et 36 heures. À 12 heures, le graphique obtenu comporte deux minimums et deux maximums. Il est donc impossible de déterminer pour

ce prélèvement la combinaison de valeurs qui amène un dénombrement bactérien maximum ou minimum. À 24 et 36 heures, il est possible de déterminer les coordonnées pour la croissance bactérienne maximum. Pour le prélèvement de 24 heures, le maximum est atteint à pH 5,5 et 39 °C. Alors qu'à 36 heures, c'est à pH 5,0 et 41,5 °C que la croissance bactérienne est maximale.

L'annexe 2c illustre l'interaction présente à 24 heures entre la température et le ratio d'inoculation. La croissance bactérienne est maximale à 30 °C et au ratio d'inoculation de 15,3 %. Il est intéressant de remarquer que lorsque la température augmente, le ratio d'inoculation pour lequel la croissance bactérienne est plus élevée diminue.

L'annexe 2d montre l'interaction présente à 12 heures entre le pH et l'agitation. Le graphique obtenu à 12 heures comporte deux minimums et deux maximums. Il est donc impossible de déterminer pour ce prélèvement la combinaison de valeurs qui amène un dénombrement bactérien maximum ou minimum. Le point médian est situé à pH 5,0 et 100 rpm pour l'agitation et correspond à un dénombrement de $1,5 \times 10^7$ bactéries/mL. Ce point correspond aux valeurs centrales des intervalles de variation des deux variables.

L'annexe 2e présente l'interaction à 24 heures entre le pH et le ratio d'inoculation. La croissance bactérienne maximale est obtenue à pH 6,4 et avec un ratio d'inoculation de 15,3 %. Il est intéressant de noter que lorsque le ratio d'inoculation diminue, les valeurs de pH les plus favorables diminuent.

4.3.2 PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Pour ce qui est des interactions entre les variables explicatives sur de la production d'acide lactique aux différents prélèvements, il est possible de constater que seulement trois types de coefficients d'interactions significatifs sont obtenus (tableau 7). De plus, ces coefficients ne sont présents que ponctuellement. La série de figures qui suit illustre les relations entre les variables explicatives.

L'annexe 3 regroupe les figures illustrant les relations entre les différentes variables explicatives pour la production d'acide lactique. L'annexe 3a présente l'influence combinée de la température et du pH sur la concentration en acide lactique aux différents prélèvements. Le coefficient de régression est présent à 48 heures. Selon cette figure, la concentration en acide lactique est maximale à pH 4.6 et à une température de 44 °C. Lorsque le pH augmente, la température optimale diminue jusqu'à 39 °C.

L'annexe 3b présente l'influence combinée de la température et de l'agitation sur la concentration en acide lactique aux différents prélèvements. Le coefficient d'interaction est présent seulement au temps de 84 heures. Les valeurs optimales de température et d'agitation sont respectivement de 35 °C et 0 rpm. Il est intéressant de noter que lorsque l'agitation augmente la température optimale augmente jusqu'à un maximum de 42,5 °C

L'annexe 3d présente l'influence combinée du pH et de l'agitation sur la concentration en acide lactique aux différents prélèvements. Le coefficient d'interaction est présent au prélèvement de 72 heures. Les conditions optimales pour atteindre une concentration en acide lactique la plus élevée sont de 0 rpm pour l'agitation et de 4,6 pour le pH. La concentration obtenue dans ces conditions est de 81,3 mM. Lorsque l'agitation augmente, le pH optimal augmente jusqu'à un maximum de 5,5.

4.3.3 CONCENTRATION EN LACTOSE.

Seulement deux types de coefficients d'interaction significatifs sont obtenus dans les modèles de la variation de la concentration en lactose (tableau 8). Des interactions sont retrouvées entre le pH et l'agitation aux temps 0, 12 et 24 heures ainsi qu'entre le pH et le ratio d'inoculation aux temps 0 et 12 heures. Les figures suivantes illustrent ces relations.

L'annexe 4 regroupe les figures illustrant les relations entre les différentes variables explicatives pour la concentration en lactose. L'annexe 4d présente les interactions entre le pH et l'agitation aux différents temps de prélèvements. À 0 et 24

heures, les figures présentent 2 minimums parfaitement symétriques. Il est impossible de déterminer une seule valeur optimale. Dans les deux cas, les minimums sont retrouvés aux valeurs minimums des deux variables étudiées, pH 4,6 avec 0 rpm et pH 6,4 avec 200 rpm. Au prélèvement de 12 heures, dans les limites étudiées, la concentration minimale en lactose est obtenue à un pH 4,6 et une agitation de 0 rpm.

Les effets des interactions entre le pH et le ratio d'inoculation sur la concentration en lactose sont présentés à l'annexe 4e. Les coefficients de régression pour ce type d'interaction sont présents aux prélèvements de 0 et 12 heures. Dans le premier cas, à 0 heure, deux minimums symétriques sont présents. Les minimums sont présents à pH 6,4 avec un ratio de 0,3 % ainsi qu'à pH 4,6 avec un ratio de 15,3 %. Dans le deuxième cas, à 12 heures, deux minimums sont aussi présents aux mêmes valeurs qu'à 0 heure.

4.3.4 PRODUCTION DE MPM^{mc}

Au niveau de la production de MPM^{mc} , deux types de coefficients d'interaction significatifs sont obtenus. Les deux types incluent une influence du pH combiné soit avec l'agitation, soit avec le ratio d'inoculation. Les figures suivantes présentent ces interactions.

L'annexe 5 regroupe les figures illustrant les relations entre les différentes variables explicatives pour la production de MPM^{mc} . L'effet combiné du pH et de l'agitation sur la production de MPM^{mc} aux différents temps de prélèvements est présenté à l'annexe 5d. L'effet est présent au temps 12, 24 et 36 heures (tableau 9). Il prend la même forme aux prélèvements 12 et 24, où l'on retrouve 2 minimums symétriques. Ces minimums sont retrouvés aux combinaisons suivantes : pH 4,6 et agitation 0 rpm ainsi qu'à pH 6,4 et agitation 200 rpm. Pour le prélèvement de 36 heures, bien que la relation soit différente, deux minimums symétriques sont retrouvés aux mêmes combinaisons.

L'annexe 5e présente les interactions entre le pH et le ratio d'inoculation aux différents temps de prélèvement. Dans ce cas-ci les interactions sont présentes aux temps 0 et 12 heures. Les deux graphiques sont du même type et présentent deux minimums

Les courbes calculées à partir des modèles ainsi que les courbes expérimentales des essais 25, 26 et 27 sont présentées à la figure 8. Ces essais sont la répétition du point central de la matrice et servent à déterminer l'erreur expérimentale à chacun des points de prélèvement. Les données calculées montrent des écarts qui pourraient être jugés acceptable pour l'ensemble des points d'échantillonnage. Cependant les écarts calculés sont supérieurs à l'erreur expérimentale à partir de 48 heures. À partir de ce point, le dénombrement calculé est inférieur aux données expérimentales d'environ $1,0 \times 10^8$ bactéries/mL.

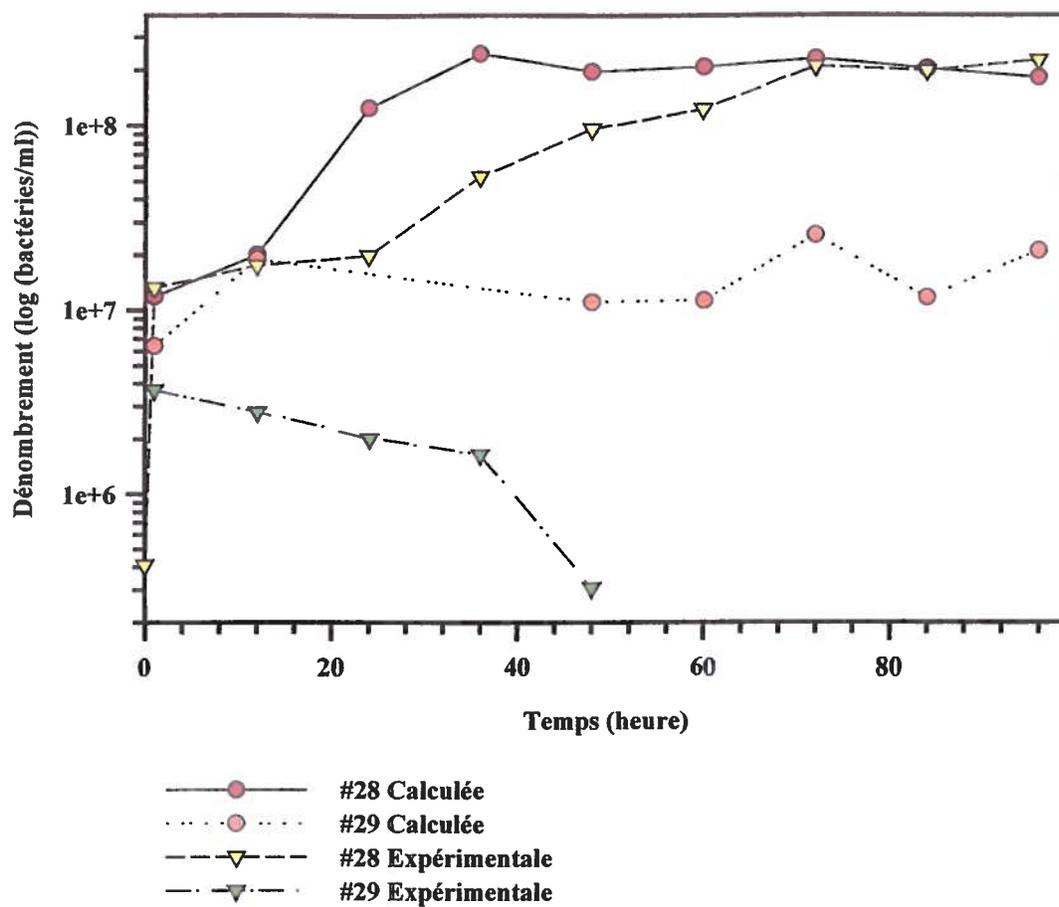


Figure 7. Courbes calculées et expérimentales de la variation du dénombrement bactérien (log(bactéries/mL)) en fonction du temps (heure) pour les essais 28 et 29.

symétriques. Les minimums sont présents aux combinaisons de valeurs suivantes : pH 6,4 et un ratio de 0,3 %, pH 4,6 et un ratio de 15,3 %.

4.4 Validation des modèles

Le plan d'expérience utilisé présente deux essais supplémentaires qui servent à la validation des modèles calculés. Cette validation est effectuée en comparant les valeurs calculées à partir des modèles aux valeurs expérimentales. La différence entre les deux valeurs donne un indice de la validité du modèle.

Il est aussi possible d'effectuer ces mêmes calculs pour tous les essais définis dans la matrice. Ces derniers calculs permettent d'obtenir une vue d'ensemble sur les performances des modèles. Cependant, comme les données des essais 1 à 27 ont servi aux calculs des modèles, la validité des modèles ne peut être basée seulement sur ces analyses.

Les tableaux des données calculées à partir des modèles ainsi que les données expérimentales pour chacune des variables dépendantes étudiées sont présentés à l'annexe 6 . De plus, l'annexe 6 comprend une série de tableaux supplémentaires des résultats de la différence entre les données calculées et les données expérimentales.

4.4.1 DÉNOMBREMENT BACTÉRIEN

Les courbes calculées à partir des modèles ainsi que les courbes expérimentales des essais 28 et 29 sont présentées dans la figure 7. Pour l'essai 28, les courbes expérimentales et calculées montrent des écarts importants entre 12 et 72 heures. Au niveau de l'essai 29, les données expérimentales montrent une croissance très faible de la souche dans ces conditions. Dans ce cas, les données calculées sont près des valeurs expérimentales sauf aux prélèvements de 24 et 36 heures où les valeurs calculées sont négatives.

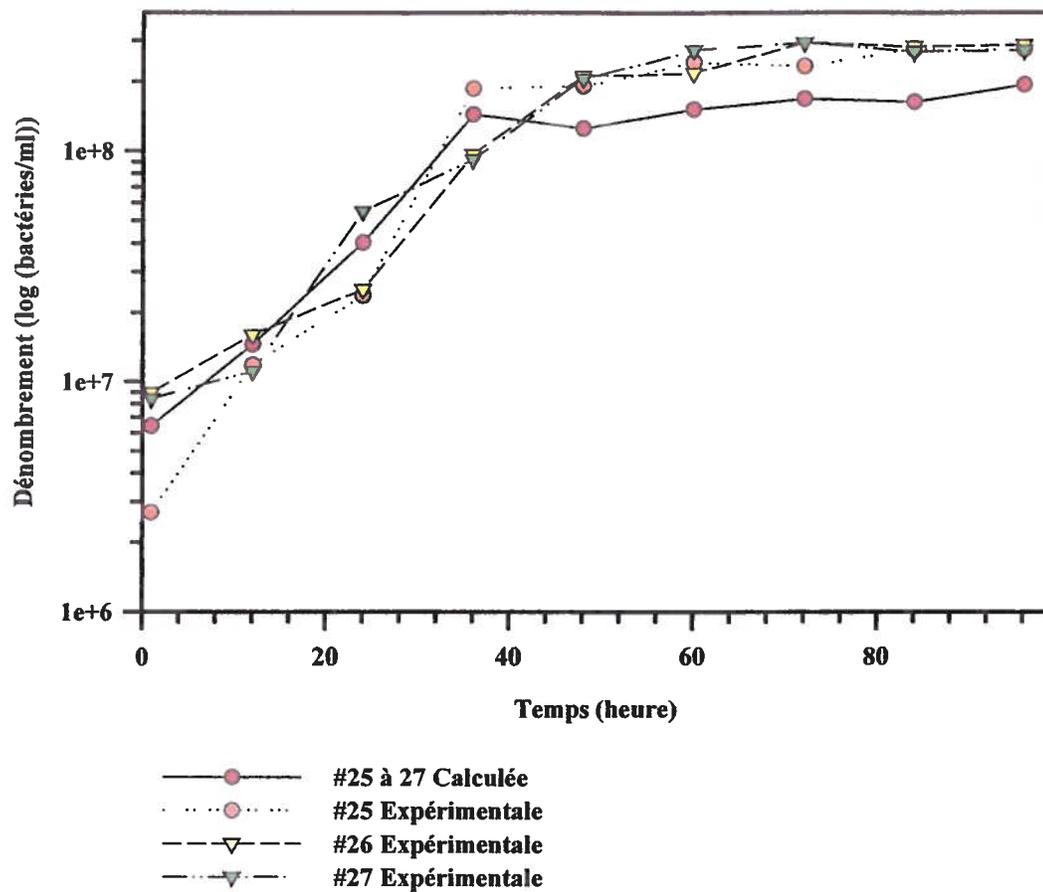


Figure 8. Courbes calculées et expérimentales de la variation du dénombrement bactérien ($\log(\text{bactéries/mL})$) en fonction du temps (heure) pour les essais 25, 26 et 27.

4.4.2 *PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE*

Les figures 9 et 10 présentent les courbes expérimentales et calculées pour les deux essais de validation ainsi que pour la répétition du point central de la matrice. Pour l'essai 28, malgré quelques écarts, les données calculées et expérimentales sont près l'une de l'autre. La concentration en acide lactique augmente de manière constante en fonction du temps. Au niveau de l'essai 29, les écarts sont plus importants à partir de 36 heures. On remarque qu'à cet essai la concentration en acide lactique n'augmente pas. De plus, il est intéressant de remarquer la baisse de concentration en acide lactique durant les premières heures de fermentation.

Les courbes expérimentales et calculées des points centraux de la matrice montrent de faibles écarts entre elles. De plus, il est intéressant de remarquer la faible variation entre les valeurs expérimentales pour un même point d'échantillonnage. La courbe calculée a tendance à sur estimer les valeurs faibles et à sur estimer les valeurs élevées. Cependant, les différentes étapes de production d'acide lactique sont retrouvées aux mêmes moments.

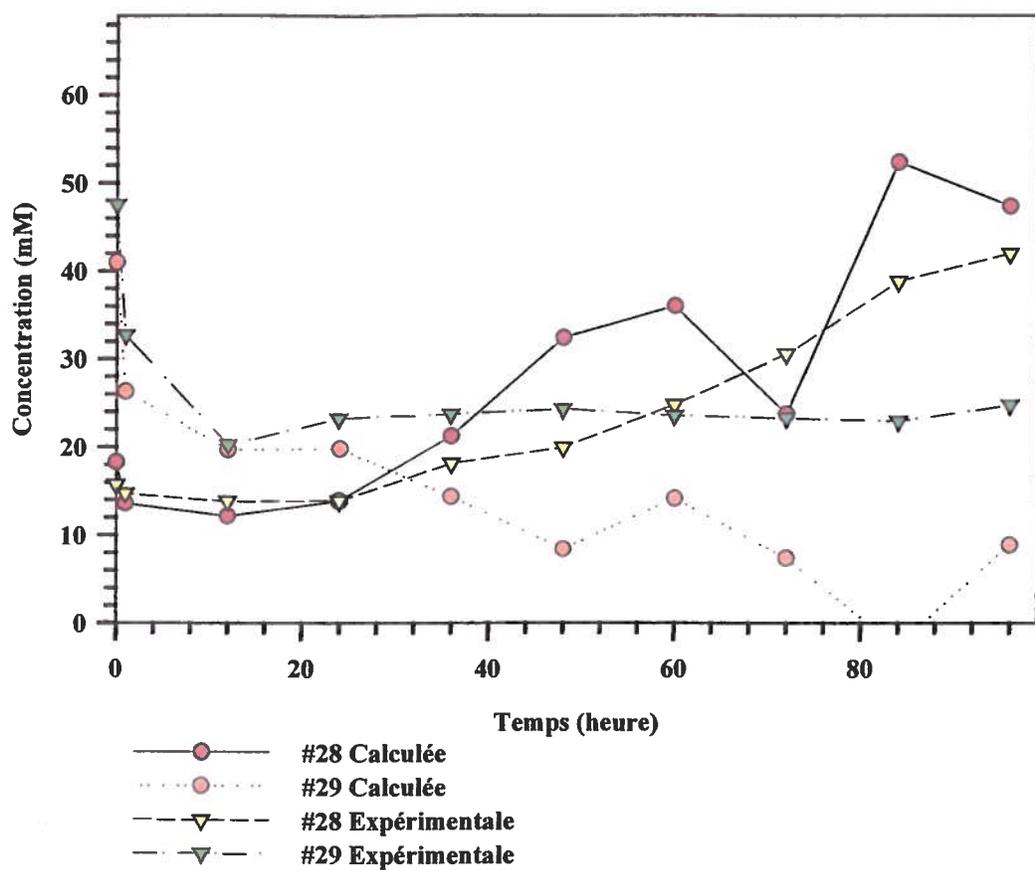


Figure 9. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la concentration en acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) pour les essais 28 et 29.

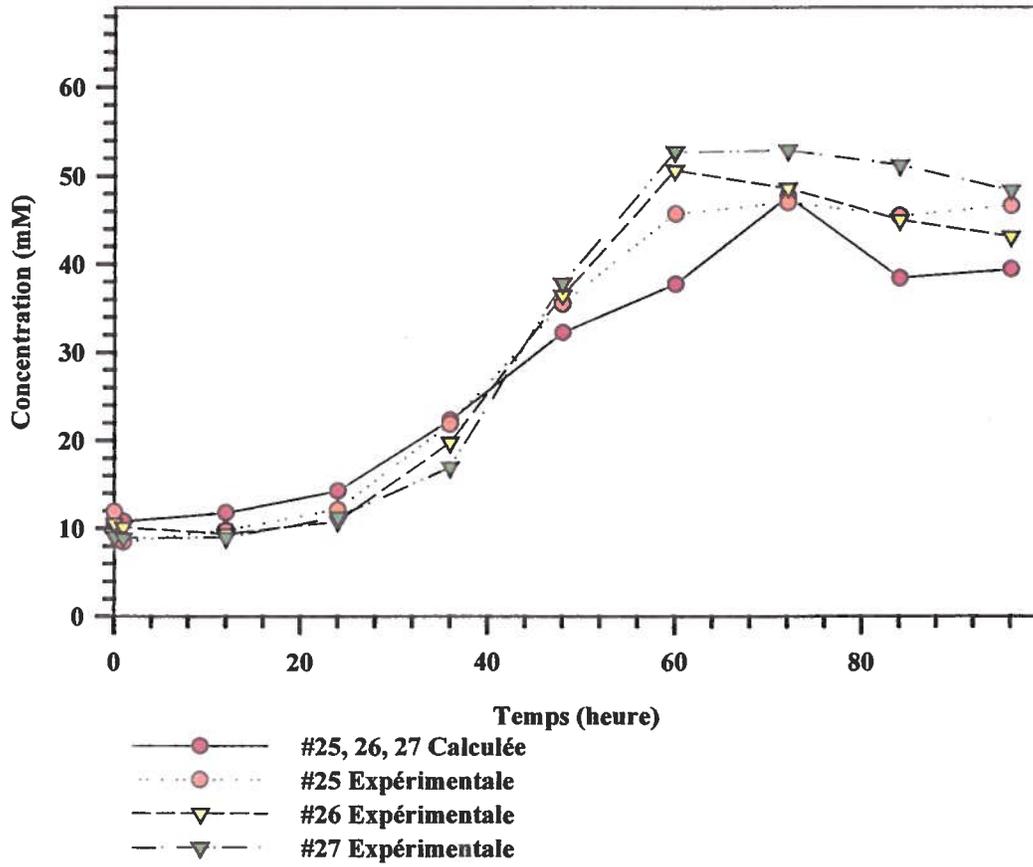


Figure 10. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la concentration en acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) pour les essais 25, 26 et 27.

4.4.3 CONCENTRATION EN LACTOSE

Au niveau de la validation des modèles décrivant la variation de la concentration en lactose, la comparaison entre les courbes calculées à partir des modèles et des données expérimentales pour les essais 25 à 29 sont présentées dans les figures 11 et 12. On remarque que pour l'essai 28, les résultats obtenus à partir des modèles et les résultats expérimentaux présentent des différences importantes. La courbe obtenue avec les données calculées ne reflète pas l'allure de la courbe expérimentale. Cependant, pour l'essai 28, les données calculées semblent s'accorder davantage avec les données expérimentales. Bien qu'il existe des différences importantes, la courbe calculée reflète mieux la courbe expérimentale.

Pour les essais 25 à 27, ils représentent la répétition du point central de la matrice. Ils servent à calculer l'erreur expérimentale pour les différentes variables expérimentales étudiées. Pour ces essais, la courbe calculée à partir des modèles ne montre que peu d'écart avec les courbes expérimentales. Sur ces courbes il est facile de distinguer une première phase plateau, suivie d'une phase de diminution rapide de la concentration et finalement une dernière phase plateau. De plus, les courbes expérimentales ne montrent que peu de différences entre-elles.

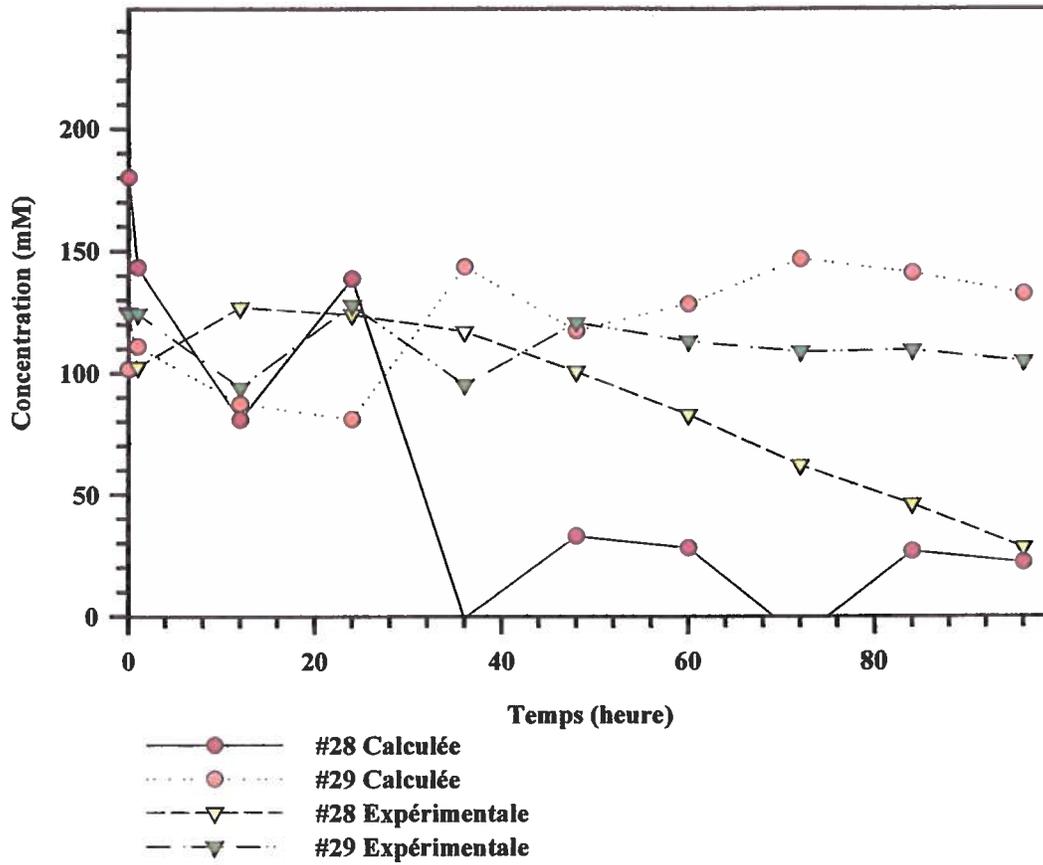


Figure 11. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la concentration en lactose (mM) en fonction du temps (heure) pour les essais 28 et 29.

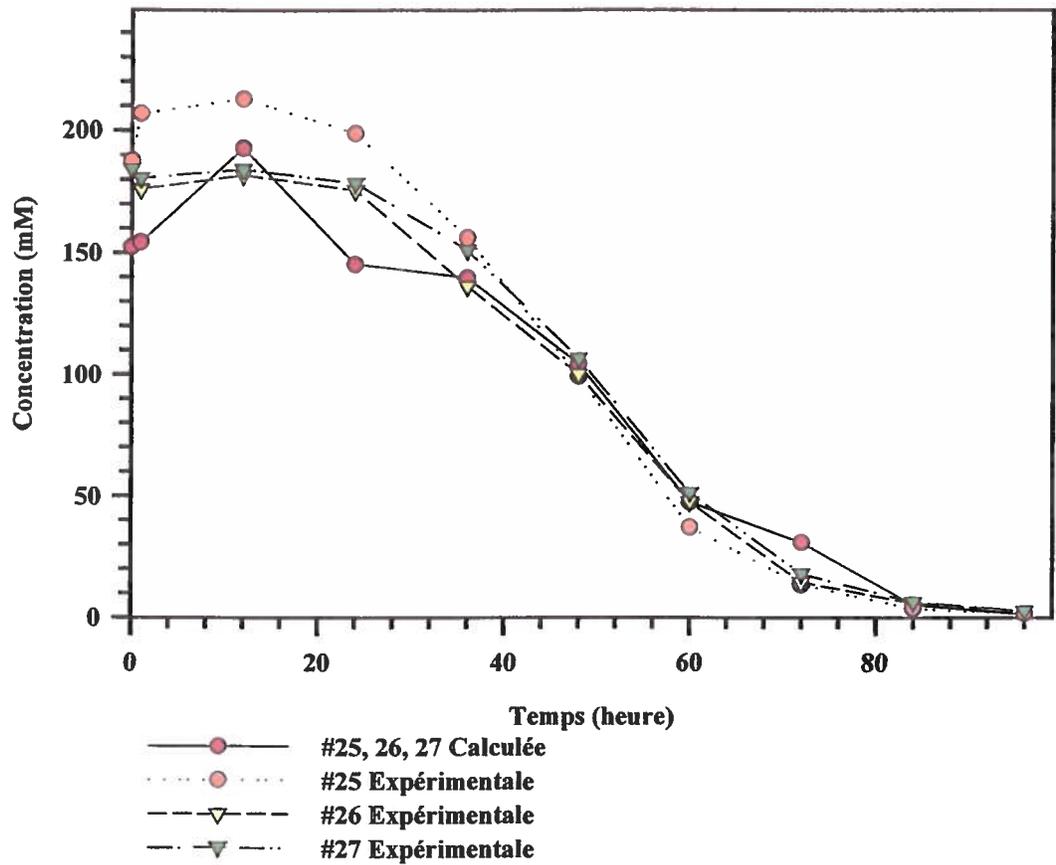


Figure 12. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la concentration en lactose (mM) en fonction du temps (heure) pour les essais 25, 26 et 27.

4.4.4 PRODUCTION DE MPM^{mc}

Les figures 13 et 14 présentent les courbes expérimentales et calculées au niveau de la production de MPM^{mc} pour les deux essais de validation ainsi que pour la répétition du point central de la matrice. Pour les essais 28 et 29, il existe des différences importantes entre les courbes calculées et les courbes expérimentales. Néanmoins, les courbes calculées et expérimentales montrent certaines similitudes au niveau de l'allure générale des courbes.

Pour la répétition du point central de la matrice, les courbes sont présentées à la figure 14. Au niveau des courbes expérimentales, on remarque une plus grande variation que celle observée pour les autres variables dépendantes présentées. Les courbes ont cependant une première phase de plateau suivi d'une phase de diminution et finalement une nouvelle phase de plateau. La courbe obtenue à partir des modèles est du même type. Cependant, jusqu'à 36 heures, les valeurs sont sous-estimées par rapport aux valeurs expérimentales.

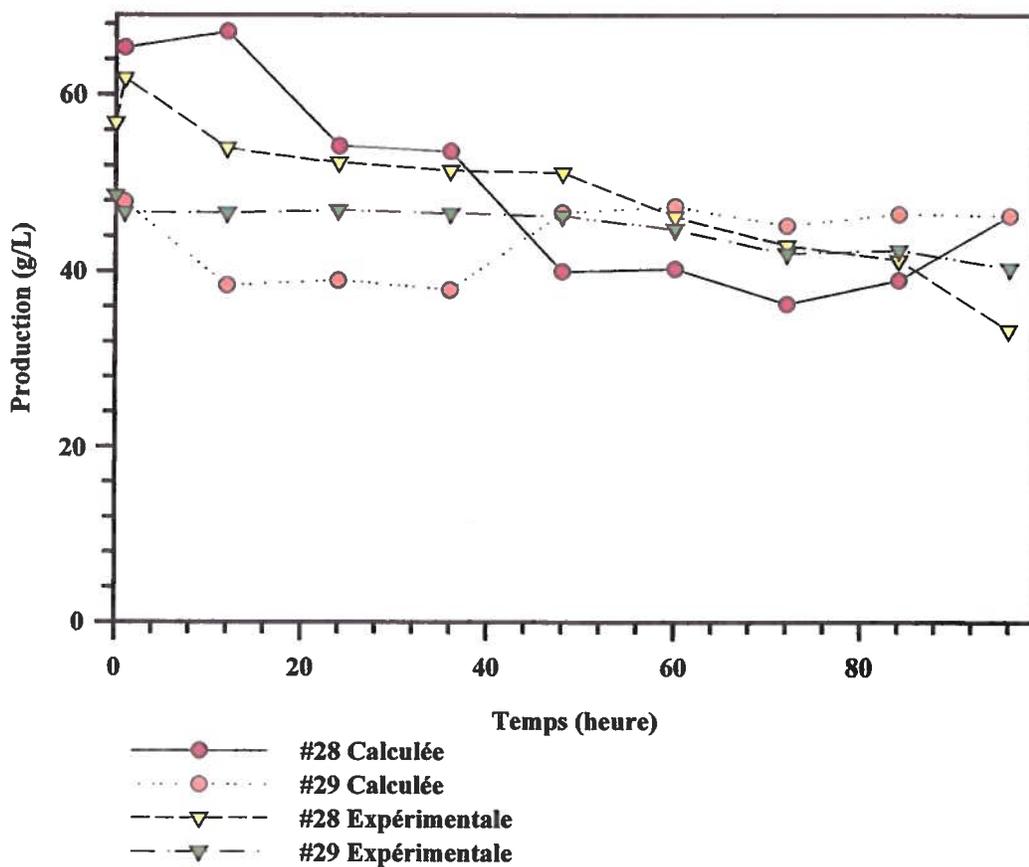


Figure 13. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) pour les essais 28 et 29.

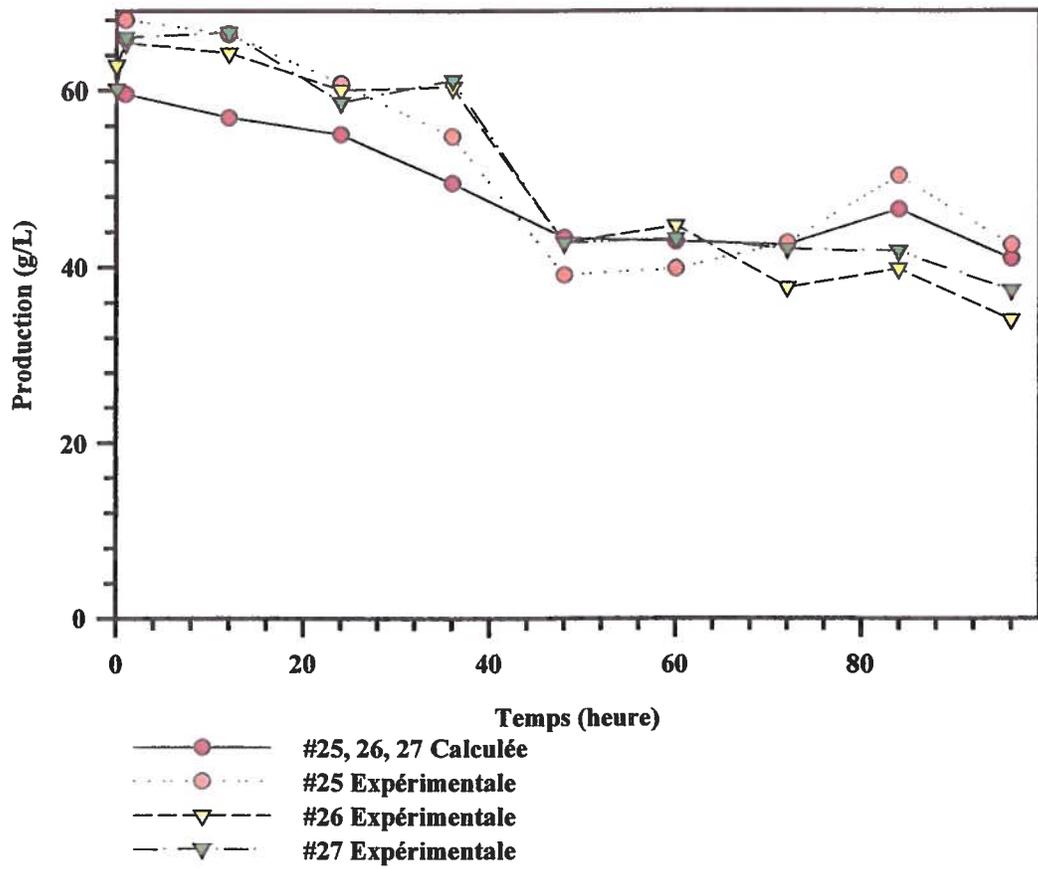


Figure 14. Courbes calculées et expérimentales de la variation de la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) pour les essais 25, 26 et 27.

4.5 Suivi des monosaccharides

Le suivi de la concentration en glucose et en galactose a été réalisé parallèlement au suivi de l'utilisation du lactose par la souche ES R2C2. Les études ont montré qu'en fonction du temps, la concentration en galactose augmentait proportionnellement à la diminution de la concentration en lactose. Au niveau de la concentration en glucose, les résultats obtenus ne montrent que de faibles quantités de glucose présentes de manière sporadique.

4.6 Solide totaux et cendres

Les études de la variation des solides totaux et des cendres ont été réalisées sur l'ensemble des MPM^{mc} produits durant les fermentations. Les résultats obtenus ont montré que dans les conditions étudiées il n'y avait pas de variation notable entre les données obtenues pour les différentes fermentations. C'est pourquoi les calculs statistiques n'ont pas été effectués pour ces analyses. Cependant, le pourcentage moyen de solides totaux, d'humidité, de matière organique et de cendres dans le MPM^{mc} ont pu être déterminés. Pour les solides totaux qui représentent le poids de l'échantillon sec, le pourcentage moyen est de 13,8 % (p/p). Le pourcentage d'humidité est donc de 86,2 % (p/p). Pour ce qui est du pourcentage de matière organique la valeur moyenne est de 7,5 % (p/p), il représente le poids sec de l'échantillon moins le poids des cendres. Les cendres sont en fait les solides inorganiques, leur valeur moyenne est de 6,2 % (p/p).

DISCUSSION

Le but de ce projet était de déterminer, à l'aide de la modélisation mathématique, les valeurs optimales de température, de pH, d'agitation et de ratio d'inoculation pour la fermentation du lactosérum non supplémenté par la souche ES R2C2. Le projet a été réalisé à l'intérieur d'intervalles de variation pour chacune des variables explicatives choisies et selon un plan d'expérience établi par la méthode de modélisation. Les variables dépendantes qui ont été suivies sont la croissance bactérienne, la production d'acide lactique, l'utilisation des sucres, en particulier du lactose, du glucose et du galactose, la production de MPM^{mc} et finalement le pourcentage de solides totaux et de cendres dans le MPM^{mc}.

La méthode de travail choisie est reconnue et utilisée pour la détermination de conditions optimales en fermentation [56, 57]. Les variables explicatives choisies ont auparavant été utilisées et leur influence reconnue lors d'études similaires pour d'autres souches de microorganismes [58-60]. Elles ont été choisies en fonction de leur influence sur la souche étudiée ainsi qu'en fonction de leur importance d'un point de vue industriel. Certaines variables n'ont pas été retenues en raison des coûts qu'elles représentaient dans une optique de mise à l'échelle industrielle. C'est le cas des ajouts d'éléments nutritifs comme les extraits de levures ou du lactose. L'importance de ces deux variables est reconnue, mais les coûts qui leur sont associés sont trop importants pour justifier leur utilisation à l'échelle industrielle.

Les intervalles de variation des variables explicatives (tableau 3) ont été déterminés selon les données présentes dans la littérature ou lors d'expériences préliminaires. La définition des intervalles de variation de la température et du pH est basée sur les informations recueillies dans la littérature sur les conditions de culture d'une souche apparentée [38, 61-63]. Les valeurs se situent entre 29 °C et 49 °C pour la température et entre 4,6 et 6,4 pour le pH. L'intervalle de variation de l'agitation a été défini par les données fournies par Technologie Biooactis inc. qui montrent que la souche utilisée est microaérophile. De plus, des expériences préliminaires nous ont

permis de déterminer que l'agitation des précultures de ES R2C2 amène une plus longue phase de latence. Les valeurs d'agitation sont donc comprises entre 0 et 200 rpm afin de minimiser les échanges gazeux entre le milieu et l'air. Pour ce qui est du ratio d'inoculation, l'intervalle a été déterminé en tenant compte de la concentration bactérienne à la fin de la phase exponentielle de la souche dans la préculture (3×10^8 bactéries mL^{-1}) ainsi que de la réalité industrielle. Les valeurs étudiées sont donc comprises entre 0,3 et 15,4 % (v/v) d'une préculture à 1×10^8 bactéries mL^{-1} et correspondent généralement aux valeurs rencontrées dans l'industrie alimentaire.

Le choix du modèle peut être discuté. Le modèle choisi comportait 29 essais dont 27 essais servent au calcul des coefficients de régression et deux essais servant uniquement à la validation du modèle. Les 16 premiers essais permettent de déterminer les effets propres et les coefficients du second degré. Les 8 essais suivants servent à déterminer les interactions entre les paramètres. Finalement, trois essais sont la répétition du point central et servent à déterminer l'erreur expérimentale. Dans d'autres études utilisant le même modèle, mais n'ayant que trois variables explicatives, le nombre de répétitions du point central est plus élevé. Cependant, les proportions sont conservées au niveau des autres essais [59]. Un plus grand nombre de répétitions du point central permet une meilleure évaluation de l'erreur expérimentale. Certains auteurs ont préféré répliquer l'ensemble des essais pour estimer l'erreur expérimentale [64]. Dans la présente expérience, le choix de répéter trois fois seulement le point central a été fait en fonction du temps disponible pour effectuer les essais.

Cependant, étant donné que les fermentations ont été réalisées sur une période de temps importante, des variations au niveau des manipulations et de la matière première sont plus susceptibles de s'introduire. D'ailleurs, des modifications au niveau des manipulations ont dû être réalisées aux cours des expérimentations. Ces modifications impliquaient principalement la filtration du lactosérum ainsi que la prise d'échantillons. Étant donné la nature des modifications apportées, elles n'ont pas influencé le déroulement des fermentations. Néanmoins, le nombre de répétitions du point central

aurait dû être plus élevé. De plus, la répartition de ces essais de répétition aurait dû être faite sur toute la période où l'ensemble des essais ont été réalisées.

5.1 Analyse des résultats

Les tableaux qui regroupent les coefficients de régression des modèles permettent d'avoir une vue d'ensemble sur tous les coefficients des quatre variables explicatives calculés (température, pH, agitation, ratio d'inoculation) pour chacune des variables dépendantes (Dénombrement bactérien, production d'acide lactique, utilisation du lactose, production de MPM^{mc}). Ils permettent de suivre l'évolution de l'influence des variables explicatives en fonction du temps. Il est donc possible de juger de la persistance de l'influence d'une ou plusieurs variables explicatives tout au long des fermentations. De plus, ils permettent de bien saisir les effets spécifiques à chacune des variables explicatives ainsi que les interactions entre ces dernières. Cependant, l'analyse et la compréhension de ces tableaux est ardue. C'est pourquoi, des représentations graphiques ont été incluses.

Les figures présentées sont une représentation graphique partielle des effets des coefficients de régression. Dans le cas des figures sur les effets spécifiques à chacune des variables explicatives, tous les coefficients de régression autres que ceux de la variable étudiée ainsi que les coefficients d'interactions ont été ignorés. De sorte que les interactions entre les variables explicatives ne sont pas incluses dans ces figures. Ils permettent néanmoins de bien saisir l'effet d'une variable explicative sur une variable dépendante.

Pour ce qui est des graphiques sur les interactions entre les variables explicatives, seules les interactions entre deux variables ont été étudiées. Les interactions entre les autres variables ont été ignorées. C'est pourquoi les figures ne sont que des représentations partielles des effets des variables explicatives. Cependant, dans la plupart des cas, peu de coefficients d'interactions significatifs sont retrouvés, de sorte qu'il est

possible de ne présenter qu'un nombre restreint de graphiques pour l'analyse des résultats.

5.2 Croissance bactérienne

La croissance bactérienne est une variable dépendante de première importance. Plusieurs voies métaboliques dépendent directement de la croissance du microorganisme étudié. C'est le cas de la production d'acide lactique ainsi que de l'utilisation des sucres. Le tableau 6 présente les valeurs des coefficients de régression calculées pour chacun des temps de prélèvements. Les variables explicatives ayant le plus d'influence sur le dénombrement bactérien sont le ratio d'inoculation ainsi que le pH. Les coefficients de régression calculés pour ces deux variables sont les plus constants dans le temps.

La figure 3A, qui illustre l'influence spécifique de la température sur la croissance bactérienne, permet de constater que l'influence de cette variable n'est pas persistante. En effet, l'influence de la température est présente seulement durant la phase de croissance exponentielle aux temps 24 et 36 heures ainsi qu'à la fin des fermentations à 96 heures. Cependant, à ces temps, la croissance bactérienne montre de grandes variations en fonction des températures de croissance étudiées ; la croissance est très faible aux valeurs extrêmes et maximales à la valeur centrale. Des études antérieures ont montré que la température est une variable de première importance qui a une forte influence au niveau de la croissance bactérienne [27]. De plus, d'autres études menées sur une souche apparentée montrent que la croissance de la souche varie de façon importante en fonction de la température. Il semble donc que l'influence observée corresponde à ce qui est observé pour les autres bactéries, mais que les modèles calculés n'expliquent pas adéquatement le comportement de la souche tout au long des fermentations.

L'influence spécifique du pH sur la croissance bactérienne est présentée dans la figure 4A. Il est possible de remarquer que durant la phase de croissance exponentielle le pH optimal pour la croissance de la souche se situe entre 5,5 et 5,0. Par la suite, le pH optimal observé est de 4,6. Il semble donc que le pH optimal de la souche varie en

fonction de la phase de croissance. Il serait intéressant de vérifier s'il est plus avantageux de démarrer une culture de la souche dans un milieu à pH de 5,6, de laisser acidifier le milieu jusqu'à un pH de 4,6 et de maintenir ce pH jusqu'à la fin de la fermentation.

Le ratio d'inoculation est la variable explicative ayant l'influence sur la croissance bactérienne la plus marquée et la plus stable dans le temps. Les coefficients de régression présentés dans le tableau 6 montrent qu'un ratio d'inoculation élevé est préférable et favorise la croissance bactérienne. La relation entre les deux variables est linéaire et ne comporte que deux coefficients d'interaction. De sorte que la figure 6A est une représentation assez juste de l'influence spécifique du ratio d'inoculation sur la croissance bactérienne. Il est reconnu dans la littérature qu'un ratio d'inoculation élevé favorise la croissance bactérienne [25]. Il serait intéressant d'effectuer des essais à des ratios d'inoculation supérieurs à celui utilisé pour ces études. Ces essais permettraient de déterminer jusqu'à quel point l'augmentation du ratio d'inoculation est efficace. Cependant, l'efficacité recherchée doit toujours tenir compte d'une possible mise à l'échelle, ainsi que des coûts de production.

L'agitation a peu d'influence sur la croissance bactérienne, mais la tendance laisse supposer que son influence est inversement proportionnelle. Comme la souche utilisée est microaérophile, une forte agitation aurait pour résultat une augmentation des échanges gazeux. En revanche, une agitation minimale permet de limiter les échanges gazeux entre le milieu de culture et l'air. L'agitation devrait donc être réduite au minimum. Il est tout de même important de maintenir une agitation suffisante pour permettre un bon mélange du milieu afin d'être en mesure de contrôler le pH. Une valeur trop faible risque d'entraîner une hausse d'alcalinité locale. Cette hausse aurait comme effet d'entraîner un mauvais fonctionnement du système de contrôle du pH en plus de dénaturer les protéines du lactosérum.

L'étude de l'influence combinée des différentes variables explicatives est aussi intéressante (annexe 2). Cependant, les interactions observées ne sont généralement que ponctuelles (tableau 6). Ce caractère diminue l'importance portée à ces observations

puisque la persistance d'un coefficient peut être interprétée comme un indice de sa validité.

Les valeurs obtenues pour la validation des modèles dans les essais 28 et 29, montrent des différences importantes entre les valeurs calculées à partir des modèles et celles obtenues en fermentation (figure 7)(annexe 6a-c). De plus, la comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées à partir des modèles pour les fermentations 1 à 27 montre aussi des écarts importants (annexe 6a-c). La tendance généralement observée est que les modèles tendent à sous-estimer la croissance bactérienne pour les conditions de cultures favorables et à la surestimer dans les conditions défavorables. Aux conditions centrales de la matrice (essais 25 à 27), les modèles présentent des écarts importants à partir de 40 heures (figure 8). Les écarts observés sont supérieurs à l'erreur expérimentale calculée à partir de la répétition du point central (essais 25, 26 et 27). Ces résultats tendent donc à invalider les modèles obtenus pour l'étude de la croissance bactérienne.

La longue phase de latence en début de fermentation peut-être expliquée par l'utilisation de tampon phosphate (PBS) durant la préparation de l'inoculum. Lorsque les essais ont été terminés de nouvelles expériences ont montré que lorsque l'inoculum estensemencé sans passage dans le tampon phosphate, la phase de latence est diminuée à moins de 10 heures. Le tampon phosphate était utilisé pour laver les bactéries afin de ne pas ajouter de milieu de préculture dans le lactosérum. Nous croyions que l'ajout de milieu modifierait la concentration en acide lactique et en sucre du lactosérum. Cependant, cette hypothèse n'avait pas été vérifiée, ni l'effet du lavage sur la vitalité de la souche.

5.3 Production d'acide lactique

La souche utilisée est un lactobacille homofermentaire. Le produit majeur de la souche utilisée est l'acide lactique. La souche utilisée produit de l'acide lactique seulement à partir de l'unité glucose du lactose. L'unité galactose n'est pas utilisé pour la

production d'acide lactique et s'accumule dans le milieu. L'équation stœchiométrique de la production d'acide lactique ne doit donc comprendre que le glucose comme produit de départ. Le tableau 7 présente les coefficients de régression décrivant l'influence des variables explicatives sur la production d'acide lactique. Il est possible d'observer que la majorité des coefficients de régression sont présents après 48 heures. Ce temps correspond à la fin de la phase de croissance exponentielle et à la phase de plateau tel qu'observé dans l'étude de la croissance bactérienne. Les variables explicatives ayant le plus d'influence sur la production d'acide lactique sont le pH et le ratio d'inoculation, suivi de l'influence de la température et de l'agitation.

Plus particulièrement, au niveau de l'effet de la température, l'influence est présente à partir de 36 heures et dépend en majeure partie de coefficients du second degré. La figure 3C montre que cette influence varie en fonction du temps. Ainsi, à 36 heures, la température qui amène la plus grande production d'acide lactique est de 49 °C. Aux autres prélèvements, c'est à 39 °C que la production d'acide lactique est maximale. Cependant, à 48 heures, le coefficient d'interaction avec le pH fait en sorte que lorsque le pH diminue, la production d'acide lactique augmente de façon plus importante à mesure que la température s'élève jusqu'à un maximum à près de 42 °C (Annexe 2a). Étant donné les résultats obtenus pour la croissance bactérienne, le point de 36 heures pourrait être considéré comme un artéfact et ne pas être considéré.

La variable explicative ayant le plus d'influence sur la production d'acide lactique est le pH. Son influence est présente à tous les temps d'échantillonnage et dans la majorité des cas un coefficient quadratique est présent. Lorsque seul un coefficient quadratique est présent, la variation prend alors la forme d'une courbe parabolique. Dans certains cas, ce phénomène peut être considéré comme un artéfact. C'est le cas de l'influence spécifique de la température sur la production d'acide lactique au temps 72 heures (figure 3C à 72h). Dans ce cas, la production varie selon une courbe parabolique, de sorte que l'on retrouve deux minimums égaux aux valeurs de pH 4,6 et 6,4. De plus, à la figure 4C, aux temps 1 à 24 heures le même phénomène est observé sauf que la présence de coefficient de régression simple amène deux maximums inégaux aux valeurs

de pH de 6,4 et 4,6. Entre 36 et 60 heures, la relation entre la production d'acide lactique et le pH se stabilise et devient linéaire. La production d'acide lactique est favorisée par les pH plus acides. La même observation a été faite au niveau de la croissance bactérienne.

Pour ce qui est du ratio d'inoculation, son influence est présente à partir de 36 heures. Aucun coefficient d'interaction impliquant le ratio d'inoculation n'est présent et seul un coefficient quadratique est significatif. Dans tous les cas, sauf à 96 heures, une augmentation du ratio d'inoculation amène une augmentation de la production en acide lactique. Cette relation est la même que celle observée au niveau de la croissance bactérienne.

L'influence de l'agitation sur la production d'acide lactique est faible puisque seuls quatre coefficients de régression sont significatifs. Néanmoins, la figure 5C montre clairement que l'agitation minimale est préférable pour la production d'acide lactique. C'est aussi l'agitation minimale qui favorise la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus pour la validation des modèles pour l'étude de la production en acide lactique montrent des écarts entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales (figures 9 et 10)(annexe 6d-f). Ces écarts sont supérieurs à l'erreur expérimentale calculée à partir des essais 25 à 27. Cependant, aux niveaux de ces derniers essais, les valeurs calculées et les valeurs expérimentales ne montrent pas d'écart important et sont très près des valeurs expérimentales. Les modèles calculés sont près des valeurs expérimentales, mais ne peuvent prédire le comportement de la souche dans les conditions des essais 28 et 29. La validité de ces modèles est donc plus élevée que ceux obtenus pour la croissance bactérienne, mais comporte certaines lacunes au niveau de la précision.

Dans les différentes figures représentant la variation de la concentration en acide lactique, il est possible de remarquer une variation anormale en début de fermentation. Ce phénomène peut être expliqué par des variations au niveau de manipulations. Au début des fermentations, le pH était ajusté au pH de croissance déterminé dans la matrice de travail. Cependant, l'ajustement n'a pas été réalisé toujours au même moment ; avant ou

après inoculation. Nous avons remarqué que cette pratique amenait des variations non prévues de la concentration en acide lactique. Les fermentations touchées n'ont pas été reprises. Cette observation peut aussi expliquer que pour les études de la variation de la concentration en acide lactique il y ait peu de coefficients de régression qui sont significatifs durant les premières heures de fermentation.

Il est aussi intéressant de noter que dans certain cas, à partir de 48 heures, il y a une augmentation de la concentration en acide lactique accompagnée par une diminution de la concentration en lactose alors que la croissance bactérienne est en phase stationnaire. Cette observation témoigne d'un découplage entre la production d'acide lactique et la croissance bactérienne. Ce phénomène a déjà été observé à plusieurs reprises [65-67].

5.4 Utilisation des sucres

La souche étudiée a un métabolisme saccharolytique et utilise donc les sucres pour sa croissance. La souche ES R2C2 utilise le lactose présent dans le lactosérum, pour sa croissance et son métabolisme. Les résultats attendus sont donc une diminution progressive de la concentration en sucre, particulièrement en lactose en fonction du temps. De plus, l'utilisation des sucres devrait correspondre à la production d'acide lactique puisque ces variables dépendent toutes deux de la croissance bactérienne.

Lors du suivi des monosaccharides et des disaccharides, les résultats observés montrent une diminution de la concentration en sucres totaux et en lactose. Cependant, une augmentation de la concentration en galactose est aussi observée. En début de fermentation, la concentration de ce dernier est nulle. Il semble donc que la souche ES R2C2 n'utilise que l'unité glucose du lactose et rejette le galactose dans le milieu. De plus durant les fermentations, aucune accumulation de glucose n'a été observée, ce qui appuie cette hypothèse. Le rapport entre la diminution de la concentration en lactose et l'augmentation en galactose est stœchiométrique. C'est pourquoi seul le suivi de la diminution en lactose est utilisé dans les présentes analyses.

Le tableau 8 présente les coefficients de régression qui décrivent l'influence des quatre variables explicatives étudiées sur l'utilisation du lactose par la souche ES R2C2. Les quatre variables explicatives ont une influence sur l'utilisation du lactose. Cependant, c'est généralement le ratio d'inoculation qui a l'influence la plus forte suivi de la température, du pH et finalement de l'agitation.

Au niveau de l'influence spécifique de la température (figure 3D), comme dans le cas de la croissance bactérienne et de la production d'acide lactique, la température à laquelle l'utilisation du lactose est optimale est de 39 °C. Cependant, ce n'est qu'à partir de 60 heures que cette influence se fait ressentir. Il est aussi intéressant de remarquer qu'à ce temps, plus de 50 % du lactose initial a été consommé. De plus, à 96 heures, 99 % du lactose est consommé.

Pour ce qui est de l'influence du pH, contrairement à ce qui a été observé pour la croissance bactérienne et la production d'acide lactique, de 0 à 24 heures, le pH optimum est de 4,6 ou 6,4. Alors qu'à partir de 60 heures, un pH de 5,5 est celui pour lequel l'utilisation du lactose est maximale (figure 4D). La présence de deux pH optimaux de 0 à 24 heures est expliquée par le fait que pour l'influence spécifique du pH seul des coefficients du second degré sont significatifs. Les résultats obtenus varient en fonction d'une courbe parabolique et peuvent être considérés comme des artéfacts. De plus, en observant bien les coefficients de régression obtenus pour l'utilisation du lactose, il est possible de constater que l'influence du pH s'inverse entre 24 et 60 heures. Cette inversion est due aux valeurs négatives des coefficients de régression de 0 à 24 heures et aux valeurs positives des coefficients de régression entre 60 et 96 heures. Étant donné qu'en début de fermentation la concentration bactérienne est faible, il est peu probable que les effets observés soient attribuables à l'activité de la souche. Les variations sont possiblement dues à des différences aux niveaux des manipulations et au niveau des lots de lactosérum. D'importantes variations de la concentration en sucre ont été observées entre les lots de lactosérum utilisés. Ces variations pourraient être dues aux conditions de production du lactosérum ainsi qu'à l'activité de la flore bactérienne avant la stérilisation. Comme les essais 25 à 27 ont été réalisés sur seulement deux lots différents, la variation

réelle de la concentration en sucre a pu être sous-estimée et les coefficients biaisés. C'est pourquoi seuls les résultats calculés à partir de 60 heures sont retenus.

Au niveau de l'influence du ratio d'inoculation, cette variable est celle qui a le plus d'influence sur l'utilisation du lactose. Les coefficients obtenus ainsi que la figure 6D montrent clairement que le ratio d'inoculation le plus élevé favorise une plus grande utilisation du lactose. Cette observation a aussi été faite pour la croissance bactérienne et la production d'acide lactique. La relation entre le ratio d'inoculation et l'utilisation des sucres est linéaire à presque tous les temps de prélèvement puisque seulement quatre coefficients du second degré sont présents.

Pour ce qui est de l'influence de l'agitation sur l'utilisation du lactose, les coefficients présents dans le tableau 8 montrent qu'une agitation faible favorise l'utilisation du lactose. Cette même observation a été réalisée pour la croissance bactérienne et la production d'acide lactique.

Les résultats obtenus pour la validation des modèles aux essais 28 et 29 montrent la présence d'écarts importants entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées (figure 11)(annexe 6g-i). Cependant, pour les essais 25 à 27, les résultats observés sont très près des valeurs expérimentales (figure 12)(annexe 6g-i). Comme pour l'étude de la production d'acide lactique, les modèles calculés sont près des valeurs expérimentales, mais ne peuvent expliquer le comportement de la souche dans les conditions des essais 28 et 29. La validité des modèles obtenus pour l'utilisation du lactose est acceptable, mais comporte certaines lacunes au niveau de la précision.

Lorsque les données de l'utilisation des sucres sont comparées à celle de la production d'acide lactique il est possible d'observer une certaine incohérence au niveau de la stœchiométrie. Lors d'une fermentation homolactique, l'utilisation complète d'une mole de lactose amène à la formation de 4 moles d'acide lactique. Dans notre cas, l'utilisation complète de 150 mM de lactose devrait donc amener à la formation de près de 600 mM d'acide lactique. Or, les concentrations maximales d'acide lactique mesurées se situent à près de 50 mM. Une partie de l'explication est que seul le glucose est utilisé

pour la formation d'acide lactique; le galactose s'accumule dans le milieu. Dans ce cas la concentration attendue serait de près de 300 mM, ce qui n'est pas la situation. La concentration en acide lactique semble donc sous estimée. L'écart observé ne peut être expliquée qu'en partie par les autres alternative connue pour l'utilisation du glucose (croissance, métabolisme, production d'exopolysaccharide). Une hypothèse serait qu'une partie de l'acide lactique produite serait insoluble et non détecté lors des analyses. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons observé qu'une grande partie de l'acide lactique en solution était entraînée dans lors de la récupération des MPM^{mc}. L'acide lactique retrouvée dans les MPM^{mc} serait sous forme insoluble.

5.5 Production de MPM^{mc}

Le MPM^{mc} est une matrice protéique malléable obtenue à partir de la fermentation du lactosérum par la souche ES R2C2. Cette matrice protéique peut être obtenue à tous les temps de fermentation. Les propriétés fonctionnelles (goût, texture, synérèse, drainage, capacité émulsifiante, etc.) de cette matrice varient en fonction du temps de fermentation. En début de fermentation, les propriétés fonctionnelles obtenues ne correspondent par aux critères de production établis par Technologie Biolactis. C'est durant la fermentation que le MPM^{mc} acquiert les propriétés fonctionnelles souhaitées. Les premiers essais réalisés ont montré que la quantité de MPM^{mc} produite en fonction du temps diminue. Cette diminution est accompagnée par l'amélioration des propriétés fonctionnelles de la matrice. Donc ce qui est recherché au niveau de la production de MPM^{mc} c'est la diminution de la production afin que la matrice obtenue ait de bonnes propriétés fonctionnelles. Malheureusement, pour des raisons de temps, d'équipement, et d'expertise, les tests sur les propriétés fonctionnelles n'ont pas été réalisés dans le cadre de ce projet.

Le tableau 9 présente les coefficients de régression décrivant la variation de la production de MPM^{mc} durant la fermentation du lactosérum par la souche ES R2C2. Comparativement aux autres variables dépendantes, peu de coefficients de régression ont une valeur significative. Comme pour les autres variables explicatives, c'est le ratio

d'inoculation qui a démontré la plus grande influence (figure 6B). Les meilleurs résultats aient été obtenus à un ratio d'inoculation de 15,3 %. Il est intéressant de remarquer que la diminution de la production de MPM^{mc} la plus marquée se situait entre 24 et 48 heures. C'est durant cette période que la phase de croissance exponentielle de la souche est retrouvée. Ce résultat laisse supposer que la production de MPM^{mc} serait fortement associée à la croissance bactérienne.

L'influence de la température sur la production de MPM^{mc} prend différentes formes en fonction du temps (figure 3B). Jusqu'à 24 heures, aucune influence significative n'a été relevée. À 36 heures, la température à laquelle la diminution est la plus forte est de 49 °C. Cependant, pour les autres temps où la température exerce une influence, la température optimale est de 39 °C. La même observation a été effectuée au niveau de l'influence de la température sur la production d'acide lactique. Considérant les résultats obtenus pour les autres variables dépendantes, le point de 36 heures pourrait être considéré comme un artéfact et ne pas être considéré.

Pour ce qui est de l'influence du pH sur la production de MPM^{mc}, elle est présente jusqu'à 36 heures. Cependant, comme le montrent les coefficients de régression ainsi que la figure 4B, dans tous les cas, deux pH sont optimaux. Les coefficients obtenus semblent donc inadéquats pour expliquer l'influence du pH sur la production de MPM^{mc}. L'influence de cette variable peut donc être ignorée.

Comme le montre le tableau 9 ainsi que la figure 5B, l'agitation n'a aucune influence spécifique sur la production de MPM^{mc}. L'influence de l'agitation n'est significative qu'au niveau des coefficients d'interaction avec le pH aux temps 24 et 36 heures (Annexe 5d). Dans ces cas, deux minimums de production sont présents à 0 rpm-pH 4,6 et 200 rpm-pH 6,4. Ces résultats ne permettent pas de déterminer les valeurs optimales de ces deux variables pour la production de MPM^{mc}.

Au niveau des résultats obtenus pour la validation des modèles, des écarts importants entre les résultats expérimentaux et calculés sont observés pour les essais 25 à 29 (figure 13 et 14)(annexe 6j-l). Cependant, dans le cas des essais 25 à 27, les écarts sont

observés jusqu'au prélèvement de 36 heures (figure 14). Par la suite, les résultats calculés sont compris dans l'erreur expérimentale. De plus, la comparaison des valeurs calculées et expérimentales pour les essais 1 à 24 ne montre généralement pas de différences importantes (annexe 6j-1). Il semble donc que les modèles obtenus ne soient pas en mesure d'expliquer la variation de la production de MPM^{mc} pour les essais 28 et 29. Néanmoins, ils ont une meilleure performance aux niveaux des essais 1 à 24 et pour les essais 25 à 27 à partir de 48 heures jusqu'à la fin des fermentations. Étant donné ces observations, les modèles obtenus peuvent être utilisés pour estimer la production de MPM^{mc} tout en tenant compte de leurs performances douteuses jusqu'à 36 heures de fermentation.

Pour ce qui est du suivi du pourcentage de solides totaux et du pourcentage de cendres contenues dans les MPM^{mc}, les résultats n'ont pas montré des variations importantes. Cependant, les résultats obtenus permettent de caractériser les MPM^{mc} obtenus au niveau de leur teneur en humidité, en matière organique et en minéraux

CONCLUSION

L'objectif principal du projet est de déterminer les conditions optimales de température, pH, agitation et de ratio d'inoculation, pour la culture de la souche ES R2C2 dans le lactosérum ainsi que pour la production de MPM^{mc}. La méthodologie utilisée pour atteindre cet objectif était la modélisation mathématique. Cette méthodologie a permis de déterminer avec précision et dans un nombre d'essais minimums les conditions de culture optimale de la souche utilisée par rapport aux différentes variables de fermentation étudiées.

Dans le cadre du projet, sept variables de fermentation (variables dépendantes) ont été étudiées. Il s'agit de la croissance bactérienne, de la production d'acide lactique, de l'utilisation des sucres totaux, l'utilisation du lactose, la production de MPM^{mc}, le pourcentage de solides totaux et de cendres. Cependant, pour des raisons de concision et de temps, seulement quatre de ces variables ont été conservées pour les analyses statistiques. Ce sont ces analyses qui ont été présentées dans le présent document. Voici en résumé les résultats obtenus pour ces quatre analyses.

Les valeurs des variables explicatives qui favorisent une croissance bactérienne optimale sont de 39 °C pour la température, 5,0 pour le pH, 15,3 % pour le ratio d'inoculation et 0 rpm pour l'agitation. Dans ces conditions, le dénombrement bactérien atteint un maximum de 3×10^8 bactéries/mL à 36 heures. Cependant, les essais de validation des modèles montrent de sérieux écarts entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales. C'est pourquoi, ils ne sont pas retenus pour expliquer le comportement de la souche ES R2C2 dans le lactosérum.

Les valeurs des variables explicatives pour lesquelles la production d'acide lactique est maximale sont de 39 °C pour la température, 5,5 -4,6 pour le pH, 15,3 % pour le ratio d'inoculation et finalement 0 rpm pour l'agitation. Dans ces conditions, la concentration en acide lactique maximale obtenue à 96 heures est de 63 mM à pH 5,5 et de 81 mM à pH 4,6. Les essais de validation montrent que le modèle comporte certaines

lacunes, mais qu'il peut être retenu pour expliquer le comportement de la souche ES R2C2 dans le lactosérum.

Au niveau de l'utilisation du lactose, les valeurs des variables explicatives pour lesquelles la diminution de la concentration est maximale sont de 39 °C pour la température, 5,5 pour le pH, 15,3 % pour le ratio d'inoculation et finalement 0 rpm pour l'agitation. Dans ces conditions, plus de 50 % du lactose est utilisé à 60 heures et 99 % du lactose est utilisé à 96 heures. Les essais de validation des modèles montrent des écarts importants. Cependant, les valeurs obtenues pour les essais 25 à 27 ne présentent pas d'écarts aussi importants. C'est pourquoi, la validité des modèles obtenus est considérée acceptable, mais comporte certaines lacunes au niveau de la précision.

Les valeurs des variables explicatives pour lesquelles la production de MPM^{mc} est optimale sont de 39 °C pour la température et 15,3 % pour le ratio d'inoculation. Pour le pH l'influence de cette variable explicative est indéterminée alors que l'agitation n'a aucune influence significative. Dans ces conditions, la production de MPM^{mc} obtenue est de 34 g/L à 72 heures.

En combinant les résultats obtenus pour les différentes variables dépendantes, il est possible d'estimer que les conditions optimales de culture de la souche ES R2C2 dans le lactosérum sont de 39 °C pour la température, 5,3 pour le pH et 15,3 % d'une culture à 1×10^8 bactéries/mL pour le ratio d'inoculation. Pour ce qui est de l'agitation, les résultats montrent qu'une agitation minimale est préférable. Cependant, une certaine agitation doit être maintenue afin de maintenir opérationnel le système de contrôle du pH. Dans ces conditions, la croissance bactérienne obtenue est de $3,3 \times 10^8$ bactéries/mL ; la concentration en acide lactique obtenue est de 66 mM; la concentration en lactose diminue de 99 % et la production de MPM^{mc} est de 33,6 g/L.

Finalement, la méthodologie choisie a permis d'obtenir les conditions optimales de culture de la souche ES R2C2 dans le lactosérum. Cependant, étant donné le nombre d'essais ainsi que la période de temps sur lesquels les expérimentations se sont déroulées, la précision des modèles obtenus est moins élevée que prévue. Néanmoins, les différents

résultats ont permis d'acquérir, plus de connaissances sur la production de MPM^{mc} par la souche ES R2C2, ainsi qu'au niveau du comportement de cette dernière dans le lactosérum. Ces connaissances étant indispensables à la poursuite des travaux.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet de maîtrise ne sont que le préambule des travaux qui devront être réalisés pour la mise à l'échelle industrielle du procédé. Les prochains travaux devront entre autres permettre de diminuer la phase de latence observée en début de fermentation ; déterminer à quel temps le MPM^{mc} acquiert les propriétés fonctionnelles souhaitées. Ils devront aussi être réalisés sur de plus grands volumes. De plus, étant donné que les essais ont été réalisés dans du lactosérum stérile, les prochains travaux devront être réalisés dans du lactosérum pasteurisé. Le comportement de la souche dans ces conditions devra être déterminé.

REMERCIEMENTS

La réalisation de ces travaux représente une somme de travail et d'analyses qui ont été rendues possibles par la collaboration de plusieurs intervenants. Je tiens donc à remercier, mon directeur de recherche Claude Dupont, mon codirecteur Marcel Paquet, le personnel et les étudiants du laboratoire, spécialement Roger Dubuc, Pierrette Lessard et Éric Simard. J'aimerais aussi remercier monsieur François Shareck pour sa patience et ses conseils judicieux ainsi que madame Marie Désy. Le côté technique des projets est souvent oublié, j'aimerais donc remercier spécialement le personnel de soutien de l'université qui ont apporté un aide précieuse. Ce projet a été réalisé avec la collaboration de Technologie Biolactis inc.

D'un point de vue plus personnel, les travaux réalisés ont nécessité l'appui de plusieurs personnes de mon entourage. Je ne pourrais donc pas passer sous silence les encouragements de ma compagne Angélique Longtin, le soutien de mes amis Catherine Simard et François Gagnon. Le temps passé à l'Institut Armand-Frappier n'aurait pas été aussi joyeux sans la présence de mes camarades de recherche Isabelle Bergevin, Donald Tremblay, Mélanie Giroux, Nabil Masri que je salue.

RÉFÉRENCES

1. Kleine, R., S. Achenbach, and S. Thoss, *Whey disposal by deproteinization and fermentation*. Acta biotechnologica, 1995. 15: p. 139-148.
2. Rolland, R.J., *Le lactosérum, ses utilisations*, in *Le producteur de lait québécois*. 1993. p. 34-46.
3. CQVB, *Valorisation des sous-produits de l'industrie de transformation de lait*. 1993.
4. Cayot, P. and D. Lorient, *Structures et technofonctions des protéines du lait*. Arilait Recherche ed. 1998, Paris: Lavoisier, Technique et documentation. 363.
5. Tyagi, R.D., D. Kluepfel, and D. Couillard, *Bioconversion of cheese whey to organic acids*, in *Bioconversion of waste materials to industrial products*, A.M. Martin, Editor. 1991, Elsevier Applied Science. p. 313-333.
6. Siso, M.I.G., *The biotechnological utilisation of cheese whey: a review*. Bioresource Technology, 1996. 57: p. 1-11.
7. Macrae, R., R.K. Robinson, and M.J. Sadler, *Whey and whey powders*, in *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*, A. press, Editor. 1993, Harcourt Brace Jovanovich: London. p. 4888-4891.
8. Blenford, D.E., *Whey, from waste to gold*, in *IFI*. 1996. p. 42-47.
9. Kosikowski, F., *Whey and whey foods*, in *Cheese and fermented milk foods*, C. University, Editor. 1982, F.V. Kosikowski and Associates: New York. p. 446-458.
10. Québec, I.d.l.s.d. and S. Canada, *Volume des principaux produits laitiers transformés au Québec*. 2002, Gouvernement du Québec.
11. Pearce, J.R., *Whey processing*, in *Whey and lactose processing*, J.G. Zadow, Editor. 1992, Elsevier applied science: Victoria. p. 73-89.
12. Alfa-Laval and A. Teknisk Dokumentation, *Dairy handbook / producer: Tecnisk Dokumentation AB*. Alfa-Laval AB, Dairy and food Engineering Division ed, ed. Lund. 197?, Sweden. 301.
13. Lehninger, A.L., *Principles of biochemistry*. Sally Anderson, June Fox ed. Vol. 1. 1982, New York: Worth Publisher. 1011.
14. Mann, E., *Whey utilisation part. 1*, in *Dairy industries international*. 1986. p. 11-12.
15. Blier, R., G. Laliberté, and J. de la Noüe, *Tertiary treatment of cheese factory anaerobic effluent with Phormidium bohneri and Micractinium pusillum*. Bioresource Technology, 1995. 52: p. 151-155.

16. Amrane, A. and Y. Prigent, *Analysis of growth and production coupling for batch cultures of Lactobacillus helveticus with the help of an unstructured model*. Process Biochemistry, 1999. 34: p. 1-10.
17. Amrane, A. and Y. Prigent, *Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of Lactobacillus helveticus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1999. 74: p. 33-40.
18. Krischke, W., M. Schröder, and W. Trösch, *Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized Lactobacillus casei subsp. casei*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1991. 34: p. 573-578.
19. Reddy, C.A., H.E. Henderson, and M.D. Erdman, *Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in curd protein*. Appl Environ Microbiol, 1976. 32: p. 769-776.
20. Prasher, R., R.K. Malik, and D.K. Mathur, *Utilisation of whey for the production of extracellular polysaccharide by a selected strain of Lactococcus lactis*. Microbiology, foods and feeds, nutrition, 1997. 15: p. 79-88.
21. Gassem, M.A., *Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria*. 1995. 30: p. 18-21.
22. Gassem, M.A., K.A. Sims, and J.F. Frank, *Extracellular polysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR in a continuous fermentor*. Food Science and Technology-lebensen, 1997. 30: p. 273-278.
23. Cerning, J., et al., *Isolation and characterisation of exopolysaccharide from slime forming mesophilic lactic acid bacteria*. Journal of Dairy Science, 1992. 75: p. 692-699.
24. Axelsson, L., *Lactic acid bacteria : Classification and physiology*, in *Lactic acid bacteria*, S.S.a.A.v. Wright, Editor. 1998, Marcel Dekker: New york. p. 1-72.
25. de Roissart, H. and F.M. Luquet, *Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*, ed. Lorica. Vol. 2. 1994, Uriage: Lorica. 614.
26. Riccardi, A. and F. Clementi, *Exopolysaccharide from lactic acid bacteria: structure, production and technological application*. Italian Journal of Food Science, 2000. 12: p. 23-45.
27. Prescott, Harley, and Klein, *Microbiologie*. DeBoeck-Wesmael ed, ed. W.C.B. Publishers. Vol. 1. 1995, Bruxelles: DeBoeck-Wesmael. 1014.
28. Horton, H., et al., *Principes de biochimie*, ed. D.B. Université. 1993, Bruxelles. 720.
29. Hassan, A.N., J.F. Frank, and S.I. Shalabi, *Factors affecting capsule size and production by lactic acid bacteria used as dairy starter cultures*. International Journal of Food Microbiology, 2001. 64: p. 199-203.

30. Looijesteijn, P.J. and J. Hugenholtz, *Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by Lactococcus lactis subsp cremoris NIZO B40 and optimization of its synthesis*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999. **88**: p. 178-182.
31. Cerning, J., *Polysaccharides exocellulaires produits par les bactéries lactiques*, in *Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques*, Lorica, Editor. 1994, Lorica: Uriage. p. 605.
32. Smitinont, T., et al., *Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **51**: p. 105-111.
33. Murofushi, M., et al., *Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, Administred Orrally in Mice*. Immunopharmacology, 1986. **12**: p. 29-35.
34. Yang, B. Y., J.S.S. Gray, and R. Montgomery, *Extracellular polysaccharide of Erwinia chrysanthemi CU643*. Carbohydrate Research, 1999. **316**: p. 138-154.
35. La Riviere, J.W. and P. Kooiman, *Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by Lactobacillus brevis*. Archives of Mikrobiology, 1967. **59**: p. 269-278.
36. Rosell, J.M., *Youghourt and kefir in their relation to health and therapeutics*. Canadian Medical Association Journal (The), 1932: p. 341-345.
37. Angulo, L., E. Lopez, and C. Lema, *Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain)*. Journal of Dairy Research, 1993. **60**: p. 263-267.
38. Dousset, X. and F. Caillet, *Aspects microbiologiques et biochimiques de la fermentation du kefir*. Microbiology, foods and feeds, nutrition, 1993. **11**.
39. Takizawa, S., et al., *Lactobacillus kefirgranum sp. nov. and Lactobacillus parakefir sp. nov., two new species from kefir grains*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994. **44**: p. 435-439.
40. Micheli, L., et al., *Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999. **53**: p. 69-74.
41. Abraham, A.G. and G.L. DeAntoni, *Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk*. Journal of Dairy Research, 1999. **66**: p. 327-333.
42. Fujisawa, T., et al., *Lactobacillus kefiranofaciens sp. nov. Isolated from kefir grains*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1988. **38**: p. 12-14.
43. Mukai, T., et al., *Structural investigation of the capsular polysaccharide from Lactobacillus kefiranofaciens K1*. Carbohydrate Research, 1990. **204**: p. 227-232.
44. Murofushi, M., M. Shiomi, and K. Aibara, *Effect of orally administred polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor*

- growth in mice*. Japanese Journal of Medicine Science and Biology, 1983. **36**: p. 49-55.
45. Shiomi, M., et al., *Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain*. Japanese Journal of Medicine Science and Biology, 1982. **35**: p. 75-80.
 46. Toba, T., et al., *A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains*. Agriculture Biology and Chemistry, 1986. **50**: p. 2673-2674.
 47. Yokoi, H., et al., *Some taxonomical characteristics of encapsulated Lactobacillus sp. KPB- 167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide*. International Journal of Food Microbiology, 1991. **13**: p. 257-264.
 48. Mitsue, T., K. Tachibana, and Y. Fujio, *Efficient kefir production by a mixed culture of Lactobacillus kefirifaciens KF-75 and yeast strains - Note*. Seibutsu Kogaku Kaishi Journal of the Society for Fermentation and Bioengineering, 1999. **77**: p. 99-103.
 49. Yokoi, H. and T. Watanabe, *Optimum culture conditions for production of kefir by Lactobacillus sp. KPB-167B isolated from kefir grains*. Journal of fermentation and bioengineering, 1992. **74**: p. 327-329.
 50. Sanchez, C., et al., *Uniaxial compression of thermal gels based on microfluidized blends of WPI and heat-denatured WPI*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**: p. 1162-1167.
 51. Champagne, C.P., et al., *The freeze-drying of lactic acid bacteria. A Review*. Canadian Institute of Science and Technology Journal, 1991. **24**: p. 118-128.
 52. Couture, R., D. Gagné, and C.P. Champagne, *Effet de divers additifs sur la survie à la lyophilisation de Lactococcus lactis*. Canadian Institute of Science and Technology Journal, 1991. **24**: p. 224-227.
 53. Box, G.E.P. and N.R. Draper, *Empirical model-building and response surfaces*. Wiley series in probability and mathematical statistics. Applied probability and statistics. 1987, New York ; Toronto: Wiley. xiv, 669.
 54. Marsili, R.T., et al., *High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products*. J Food Science, 1981. **46**: p. 52-57.
 55. Dubois, M., et al., *Colorimetric method for determination of sugars and related substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**: p. 350-356.
 56. Deshayes, M.P.C., *Utilisation de modèles mathématiques pour l'optimisation en fermentation. Application aux transformations par les micro-organismes*. Bulletin de la société chimique de France, 1980. **1**: p. 24-34.
 57. Kennedy, M. and D. Krouse, *Strategies for improving fermentation medium performance: a review*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999. **23**: p. 456-475.

58. Tango, M.S.A. and A.E. Ghaly, *Kinetic modeling of lactic acid production from batch submerged fermentation of cheese whey*. Transaction of the ASAE, 1999. **42**: p. 1791-1800.
59. Ergun, M. and F.S. Mutlu, *Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology, 2000. **73**: p. 251-255.
60. Kimmel, S.A., R.F. Roberts, and G.R. Ziegler, *Optimization of exopolysaccharide production by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus RR grown in a semidefined medium*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**: p. 659-664.
61. Toba, T., et al., *A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing Lactobacillus kefiranofaciens isolated from kefir grains*. Journal of Dairy Research, 1991. **58**: p. 497-502.
62. Pidoux, M., et al., *Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation*. Journal of Applied Bacteriology, 1990. **69**: p. 311-320.
63. Leroi, F. and P. Courcoux, *Influence of pH, Temperature and initial yeast :bacteria ratio on the stimulation of Lactobacillus hilgardii by Saccharomyces florentinus isolated from sugary kefir grains*. Journal of Applied Bacteriology, 1996. **80**: p. 138-146.
64. Gobbetti, M., et al., *Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and a_w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic bacteria by quadratic response surface methodology*. Enzyme & Microbial Technology, 1999. **25**: p. 795-809.
65. Kwon, S., et al., *Production of lactic acid by Lactobacillus rhamnosus with vitamin- supplemented soybean hydrolysate*. Enzyme Microb Technol, 2000. **26**: p. 209-215.
66. Concepcion, N.B.-R., M.R. Okos, and P.C. Wankat, *Kinetic Study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using Lactobacillus bulgaricus*. Biotechnol. Prog., 2000. **16**: p. 305-314.
67. Narvhus, J.A., et al., *Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk*. Int J Food Microbiol, 1998. **41**: p. 73-80.

ANNEXE 1

Composition du PBS pour 1 litre de solution concentrée 10X.

NaCl	80 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,1 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g

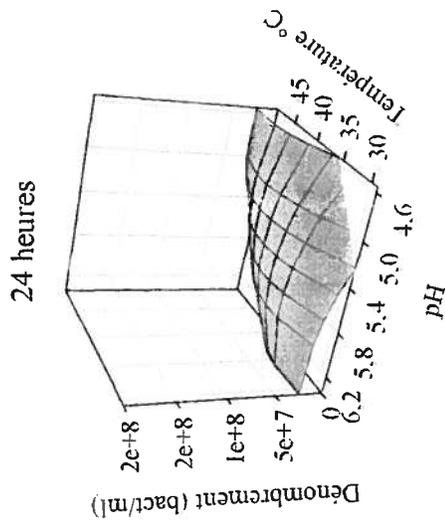
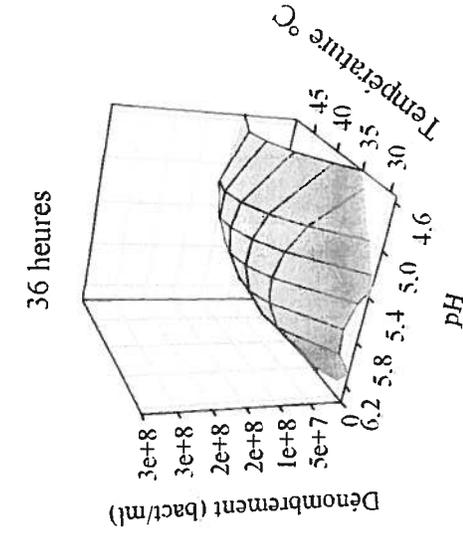
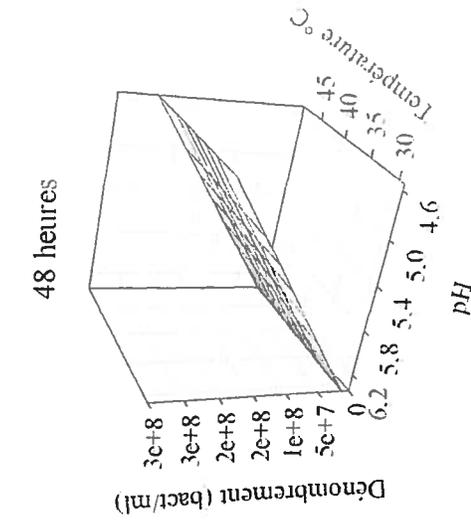
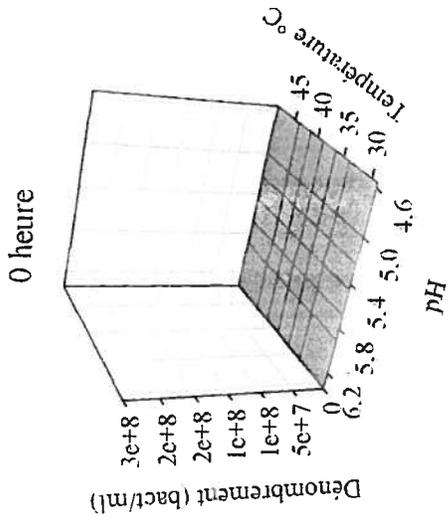
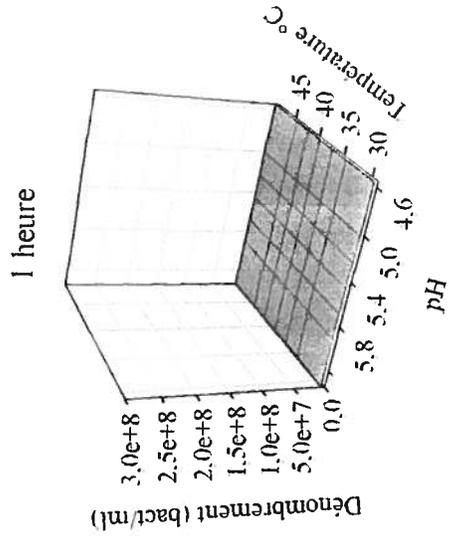
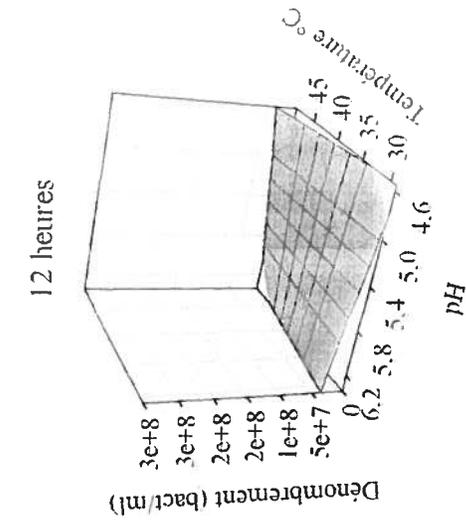
Ajuster le pH à 7,4 avec de l'acide chlorhydrique 1N.

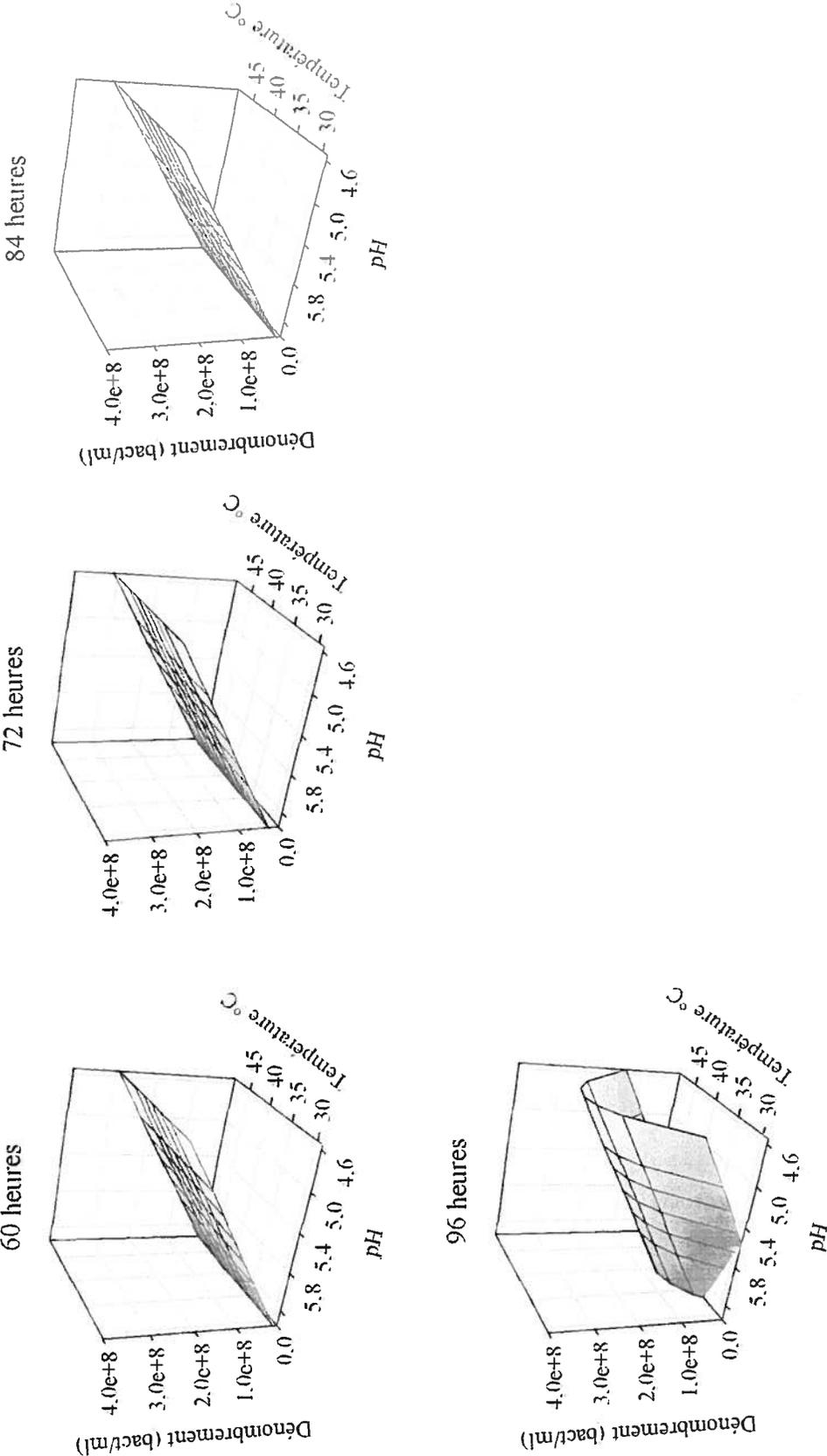
Stériliser à 121 °C 15 minutes.

Pour préparer la solution de travail, diluer la solution concentrée à 1/10 dans de l'eau distillée. Filtrer la solution à 0,2 um avec une membrane filtrante ou un filtre. Faire stériliser au besoin.

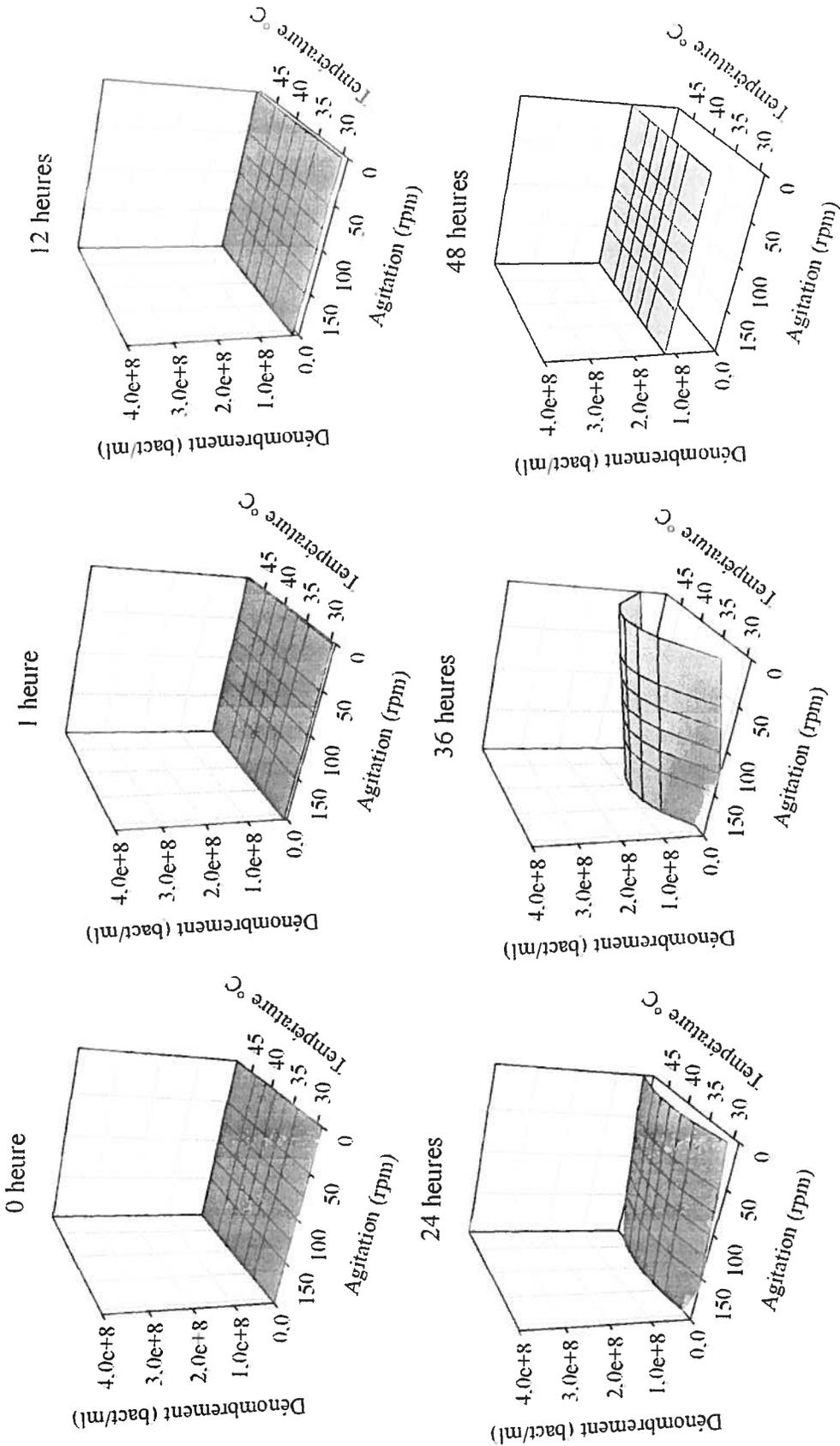
ANNEXE 2

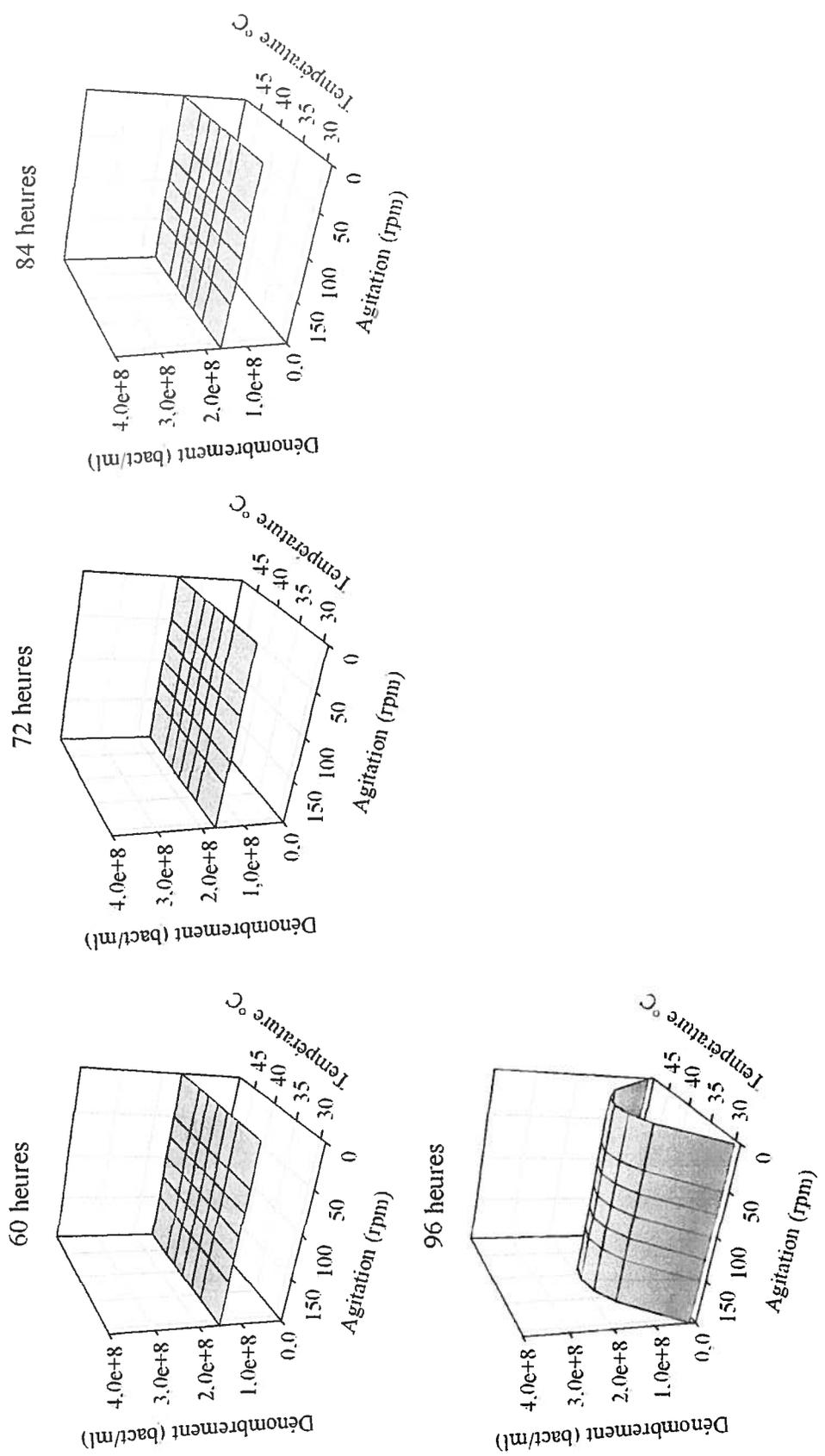
L'annexe 2 regroupe tous les graphiques des interactions du premier degré entre les variables explicatives pour les études portant sur le dénombrement bactérien.



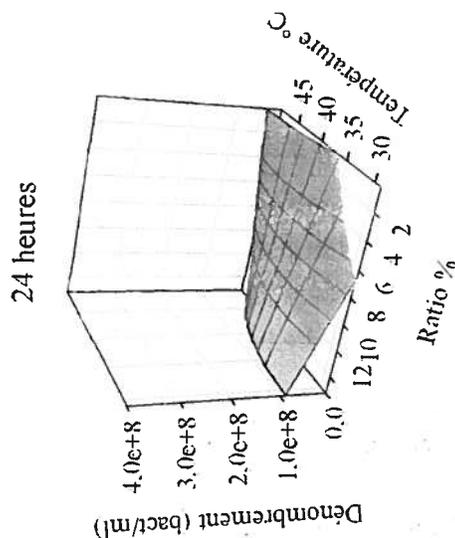
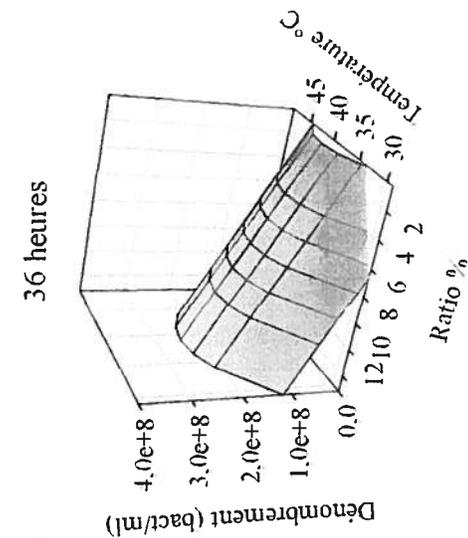
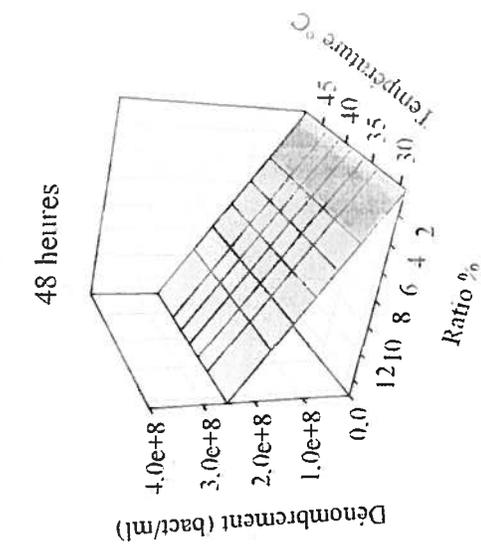
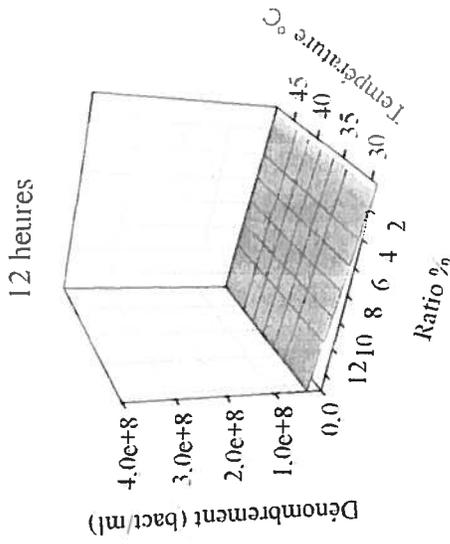
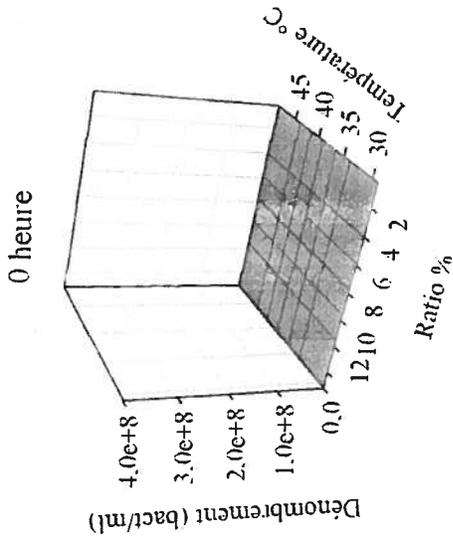
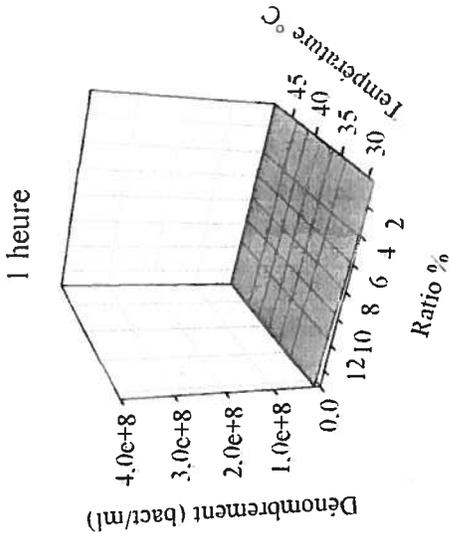
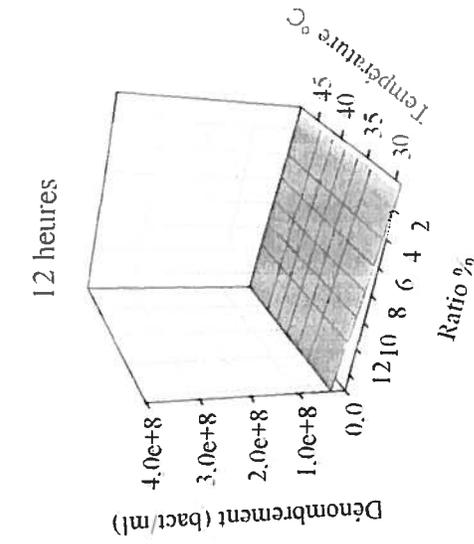


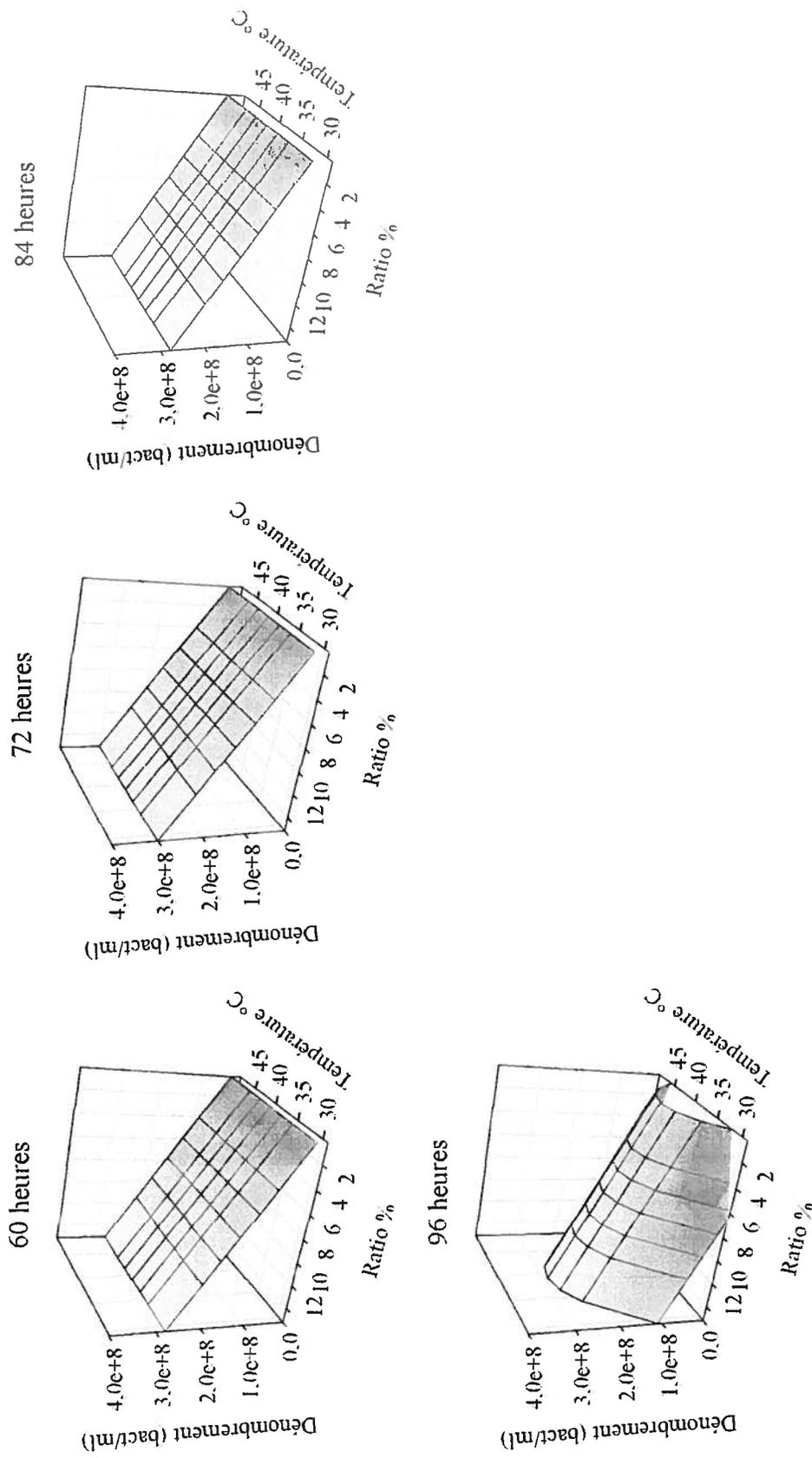
Annexe 2a : Influence combinée de la température (°C) et du pH sur le dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



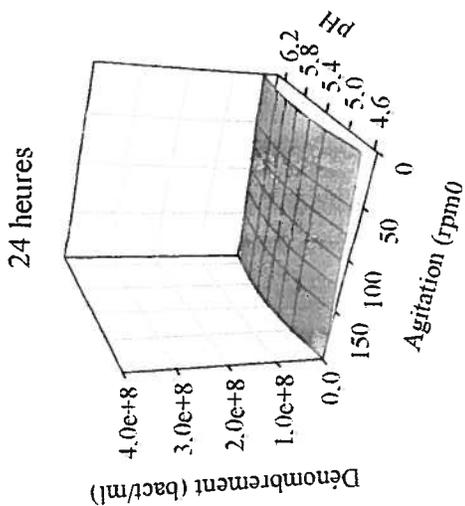
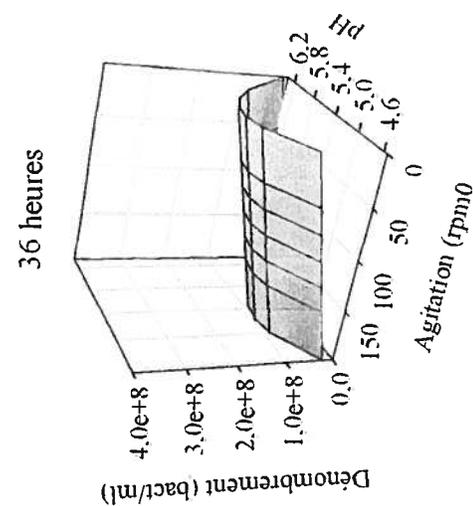
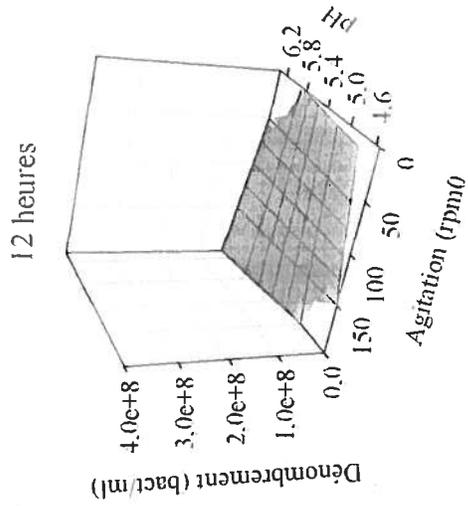
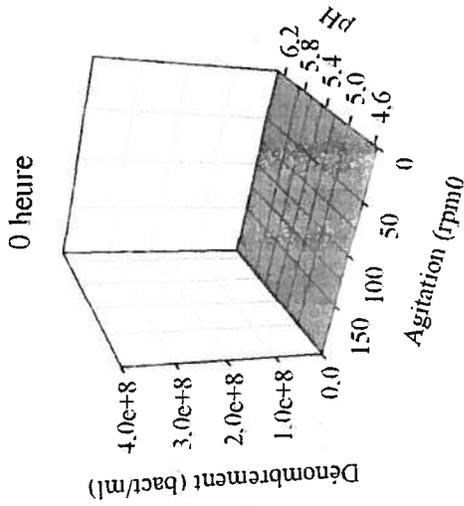
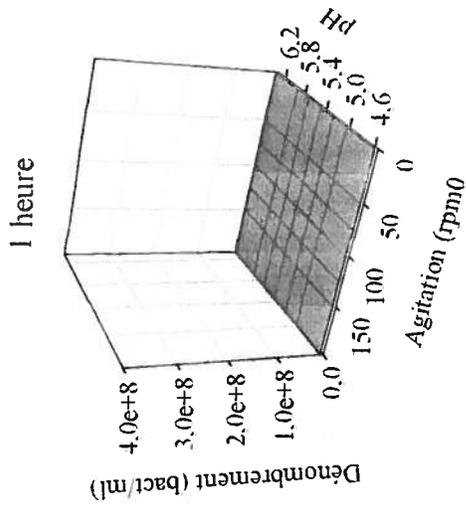
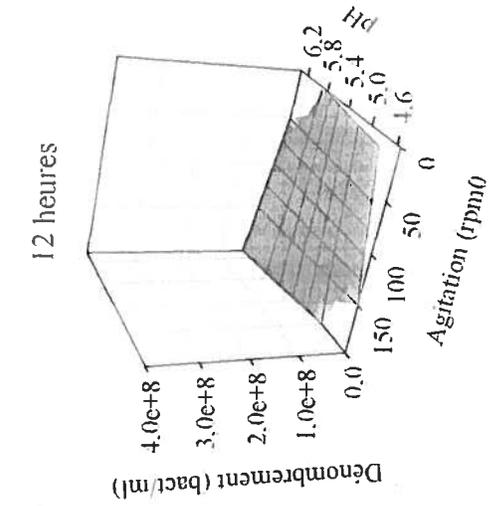


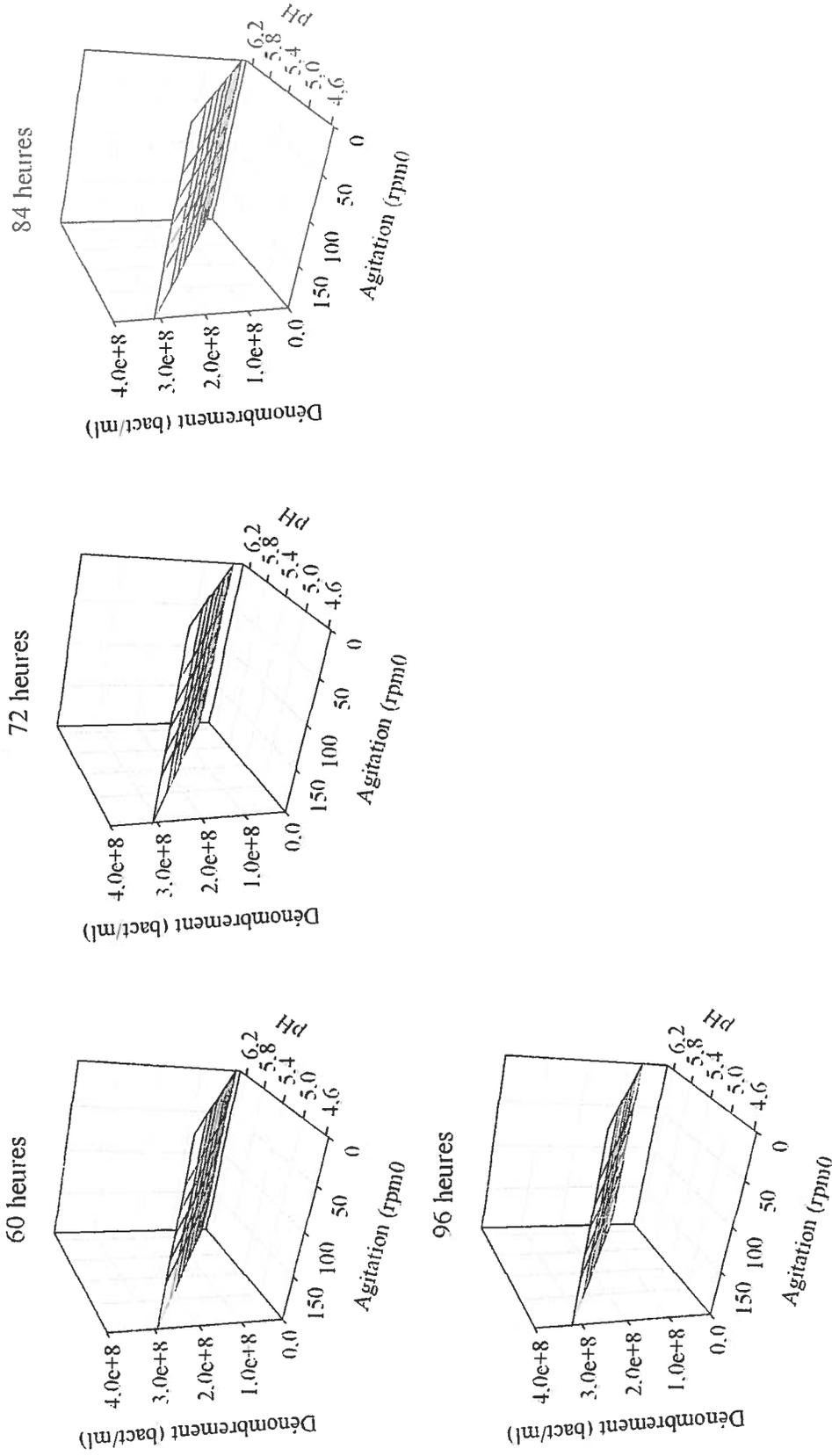
Annexe 2b : Influence combinée de la température (°C) et de l'agitation (rpm) sur dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



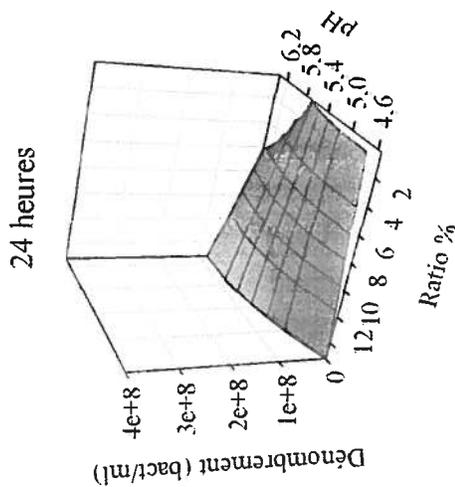
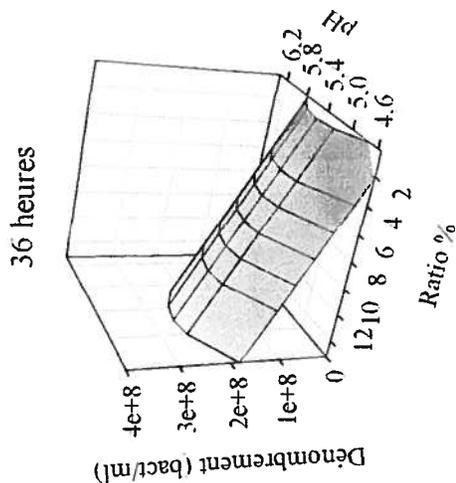
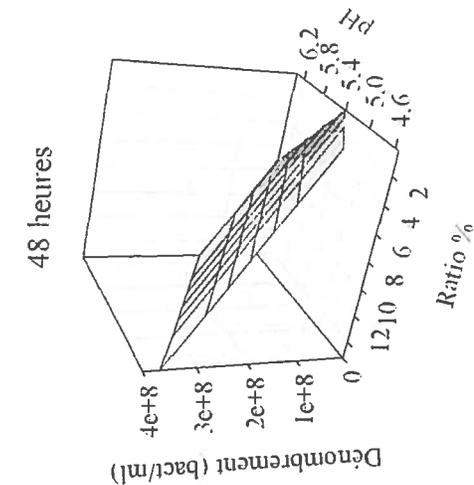
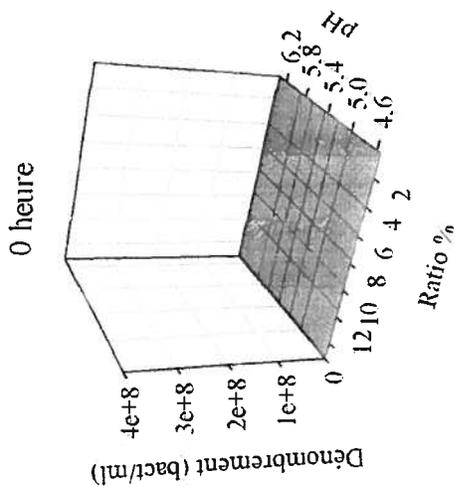
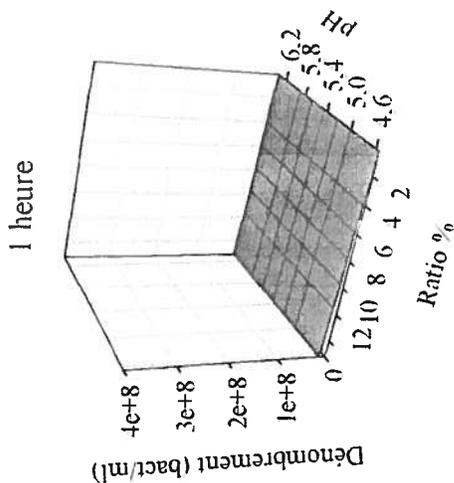
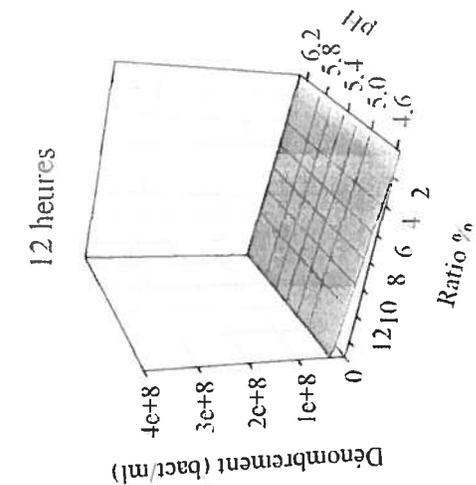


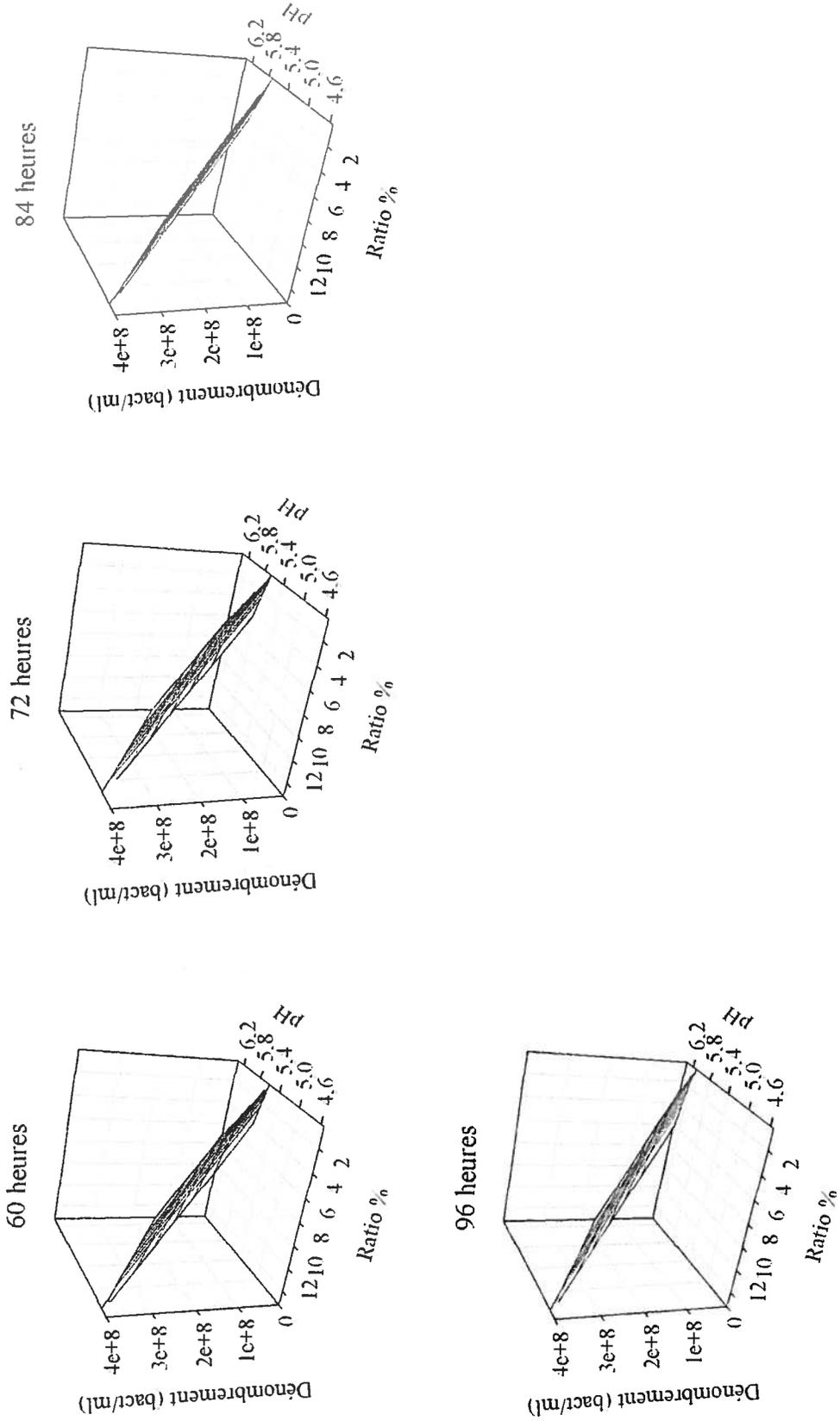
Annexe 2c : Influence combinée de la température (°C) et du ratio d'inoculation (%) sur dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



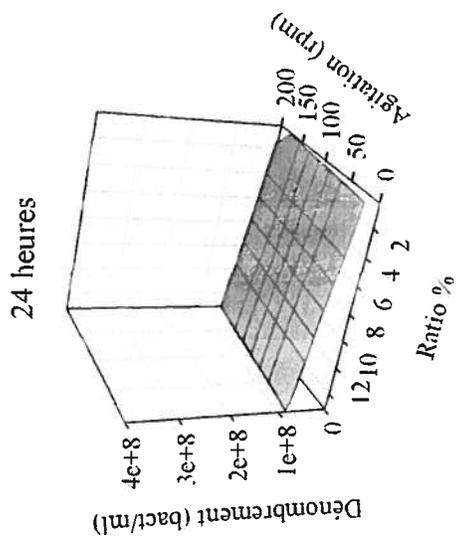
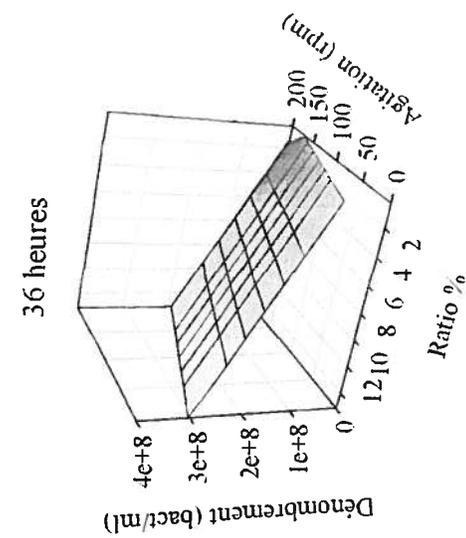
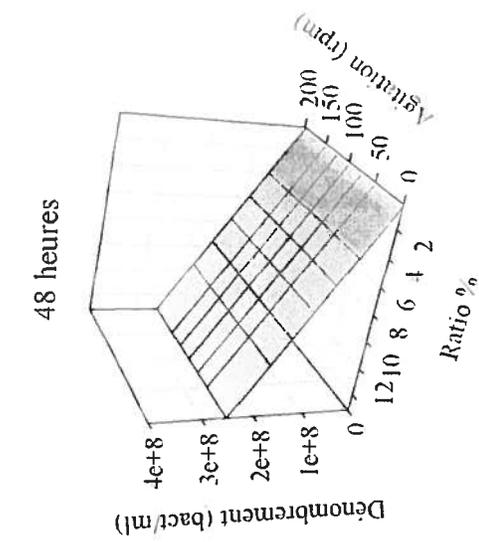
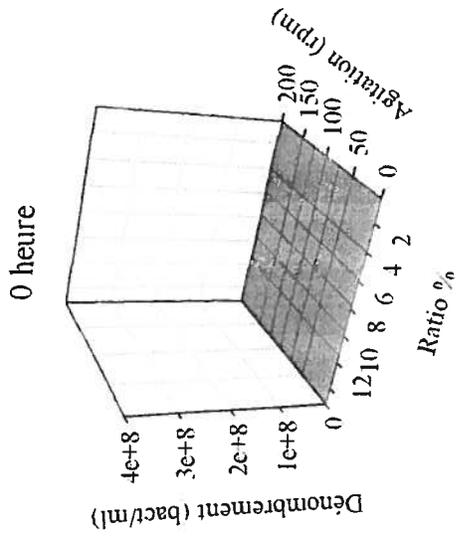
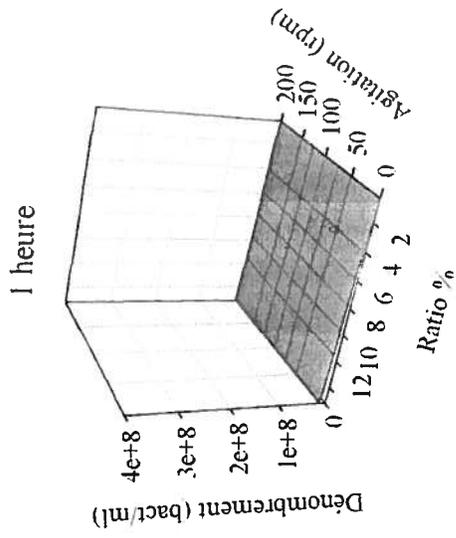
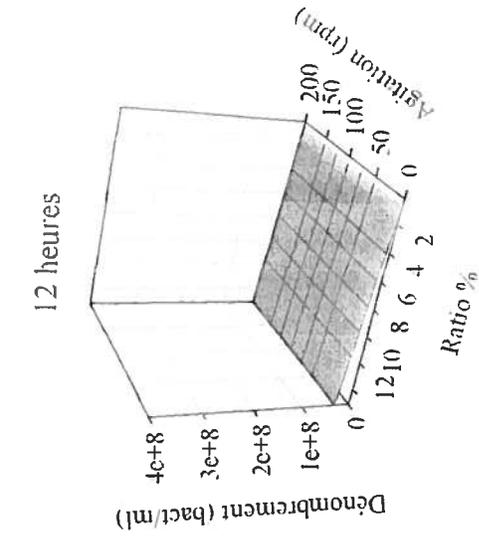


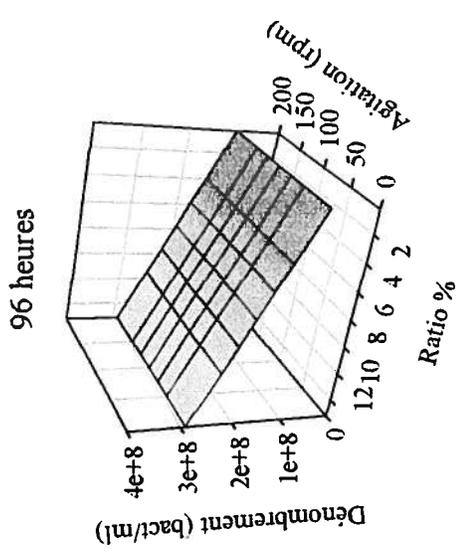
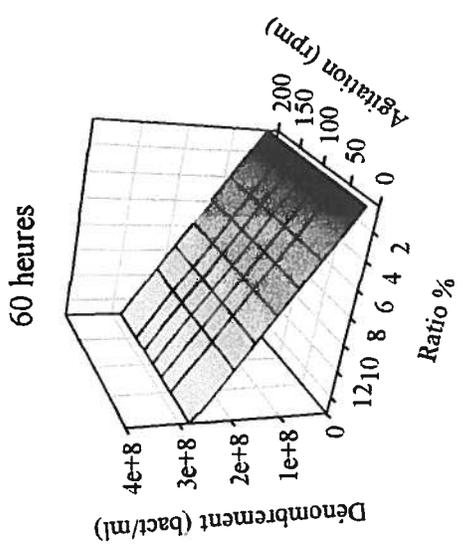
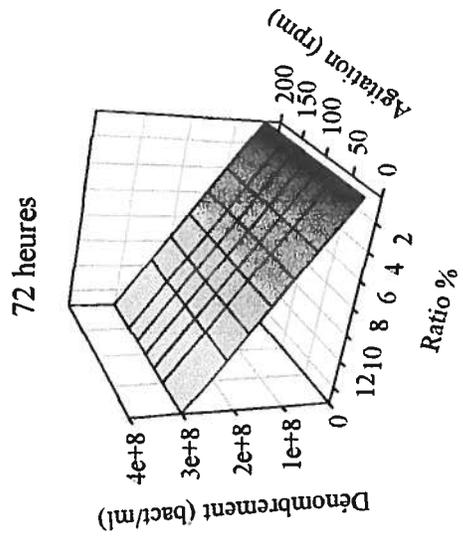
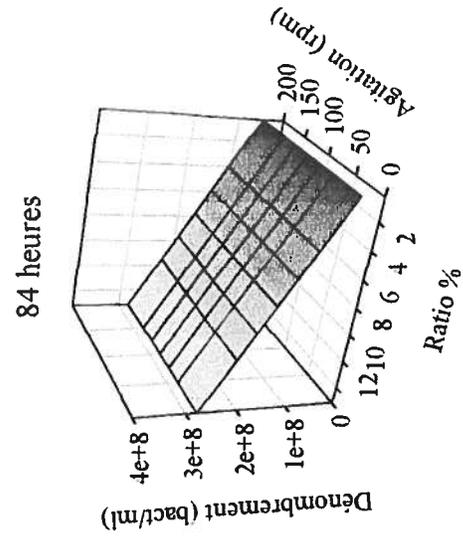
Annexe 2d : Influence combinée du pH et de l'agitation (rpm) sur dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.





Annexe 2e : Influence combinée du pH et du ratio d'inoculation (%) sur dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.

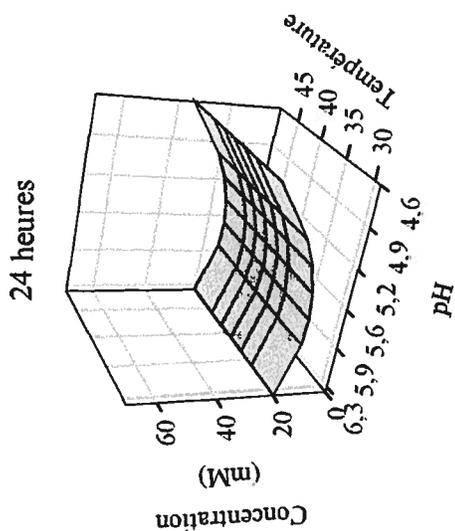
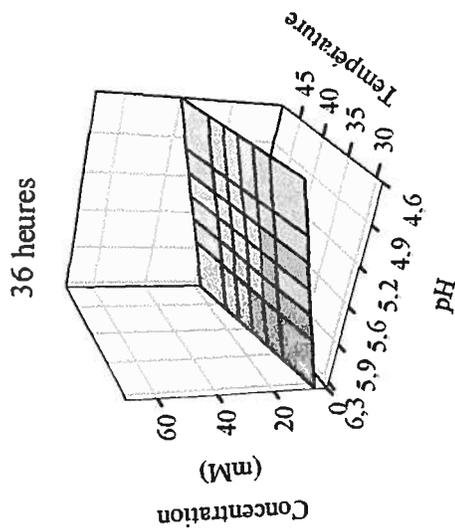
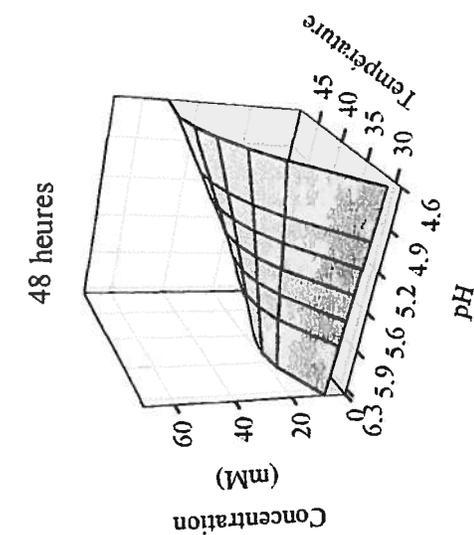
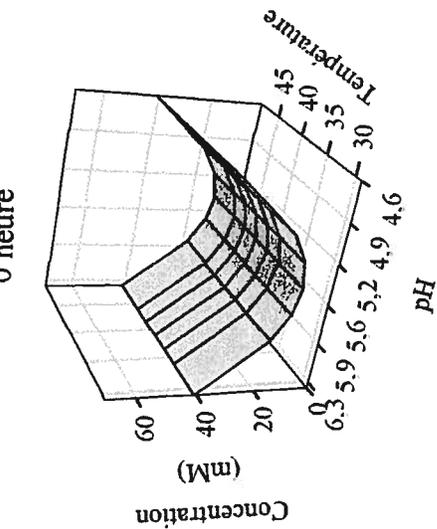
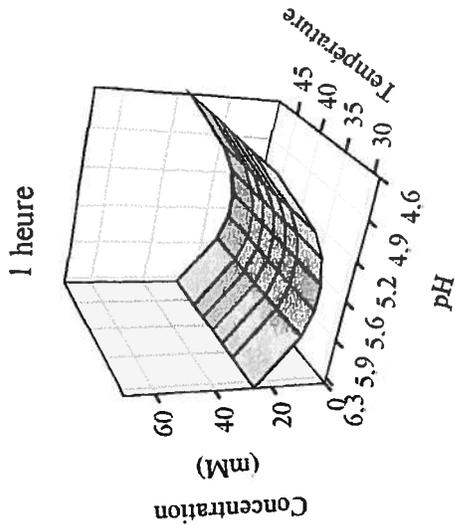
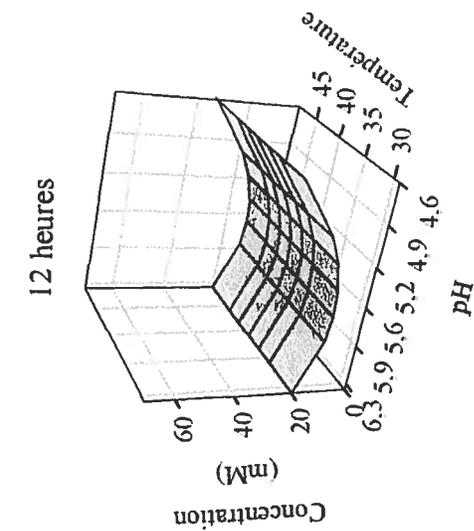


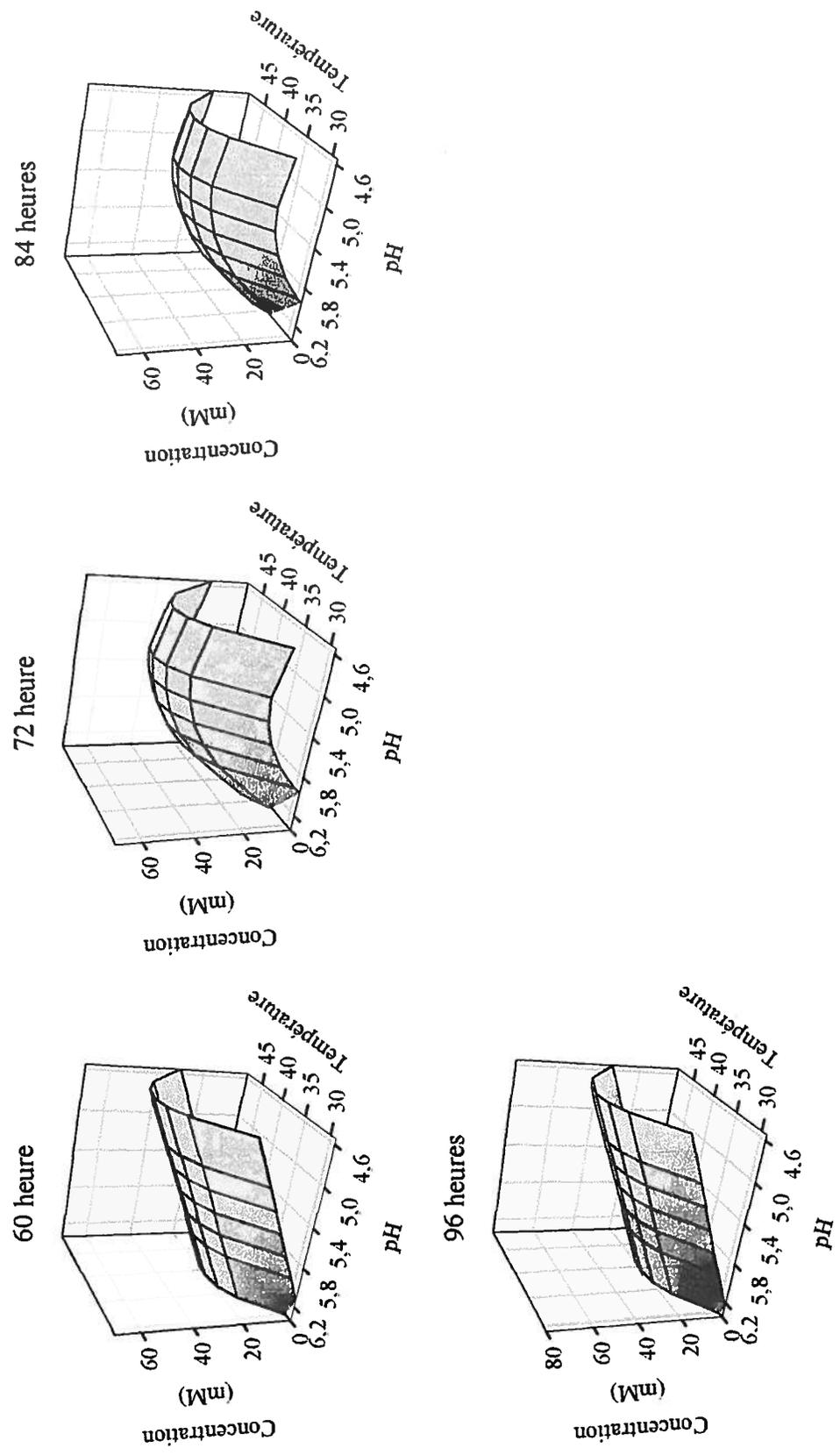


Annexe 2f : Influence combinée de l'agitation (rpm) et ratio d'inoculation (%) sur dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.

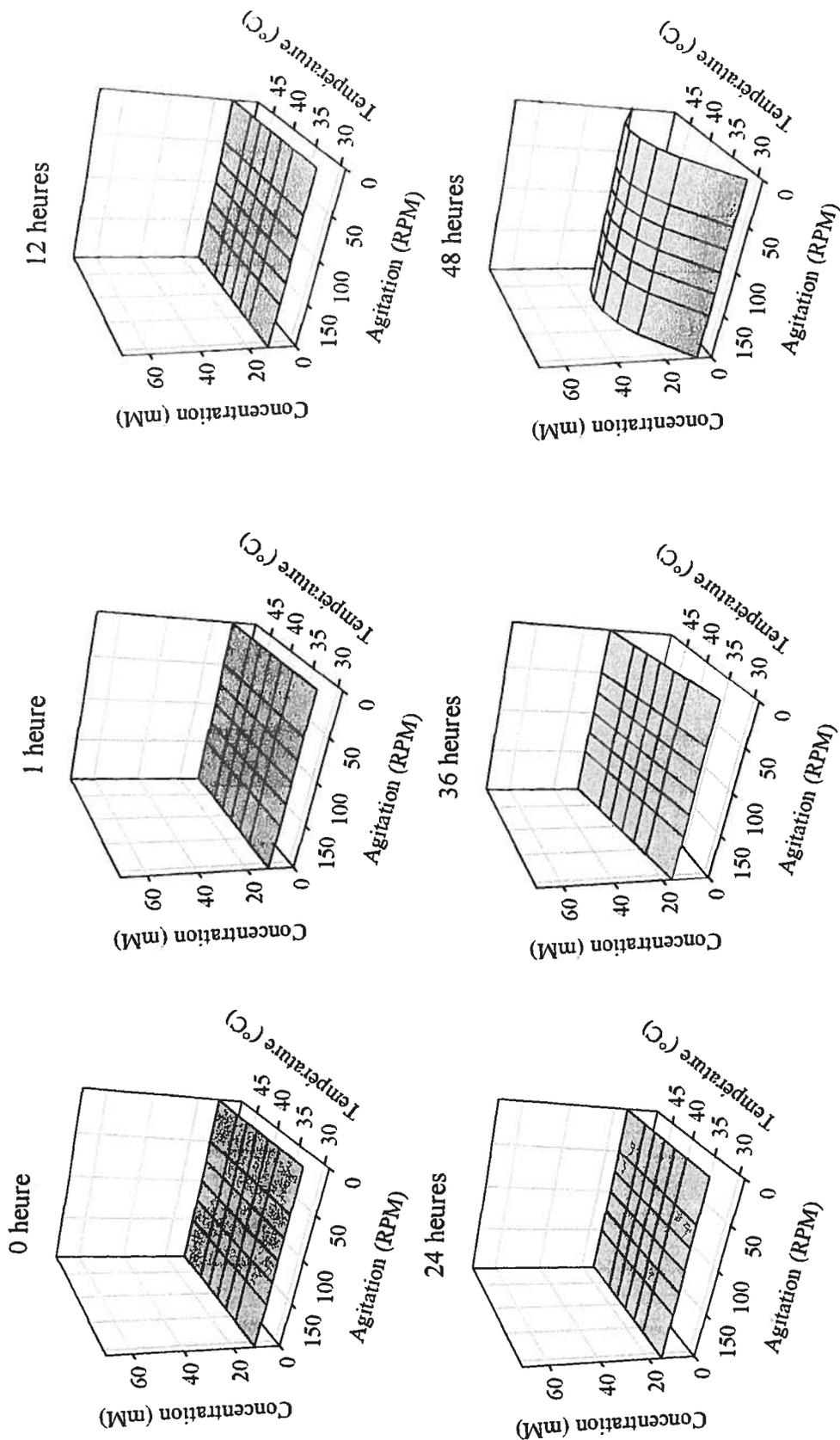
ANNEXE 3

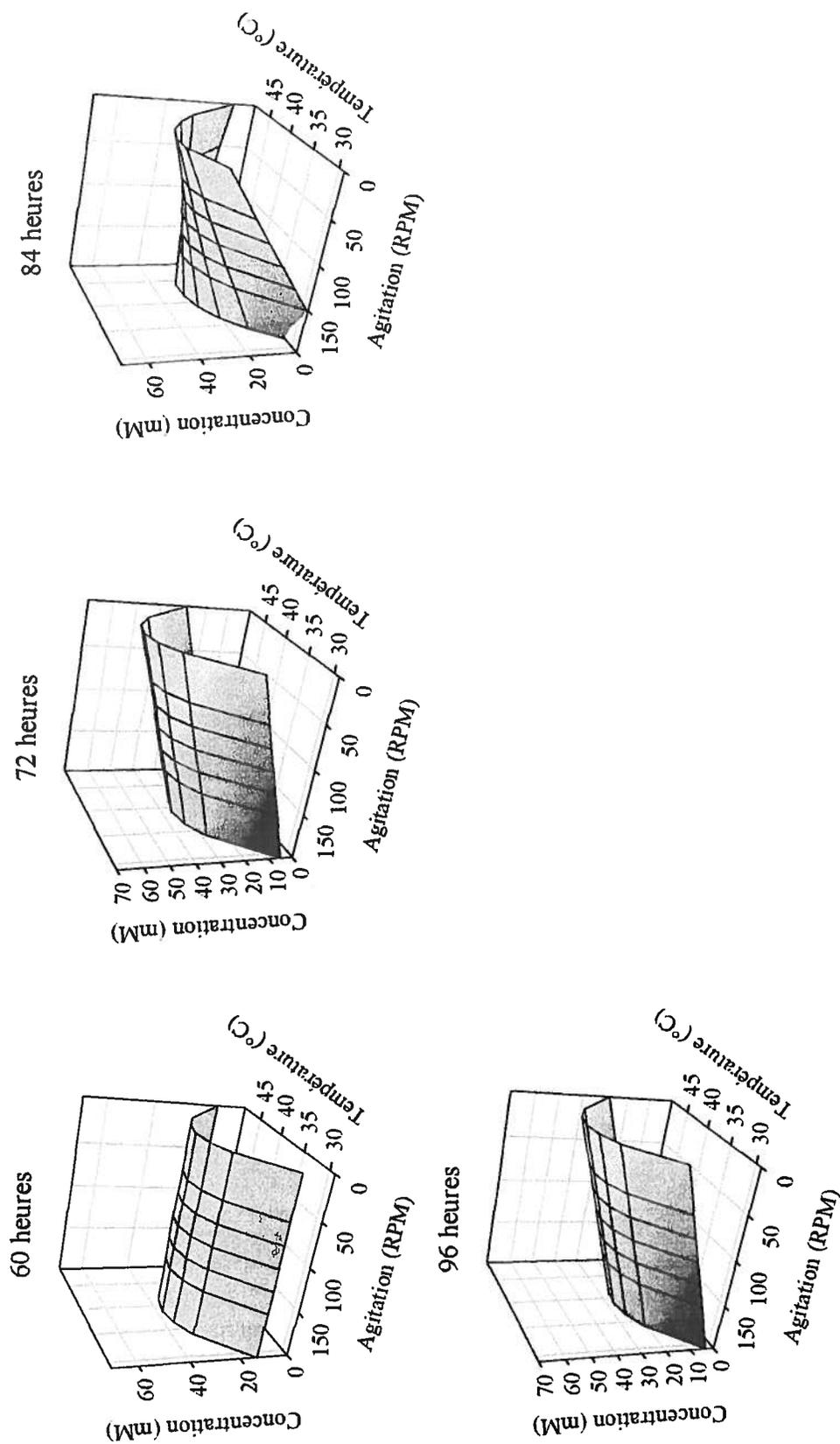
L'annexe 3 regroupe tous les graphiques des interactions du premier degré entre les variables explicatives pour les études portant sur la production d'acide lactique.



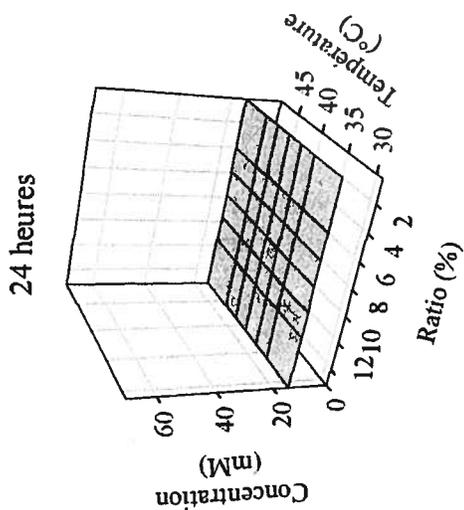
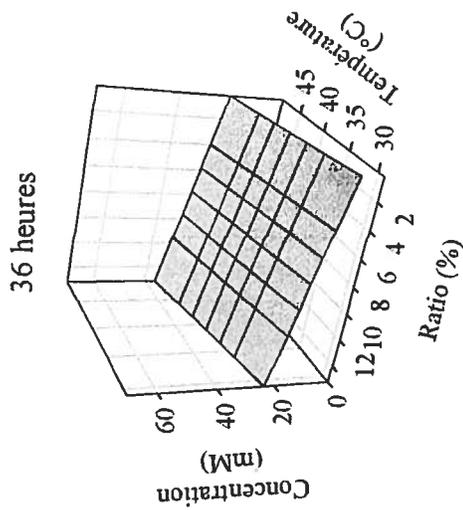
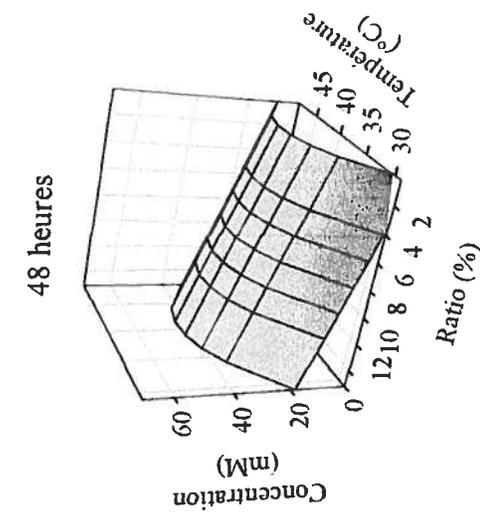
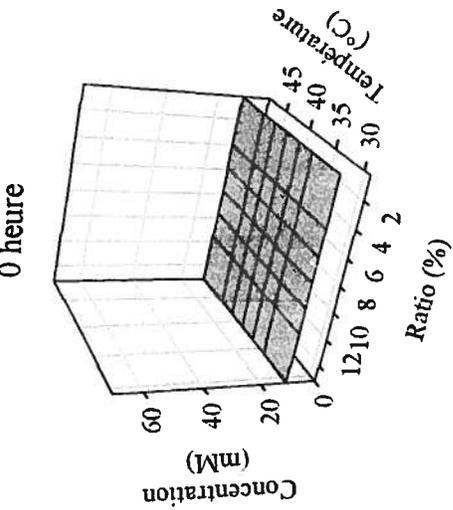
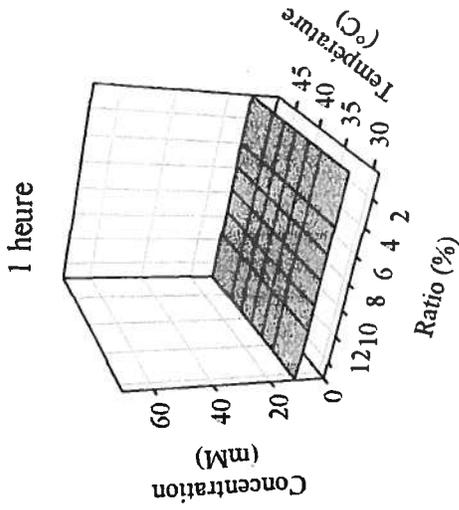
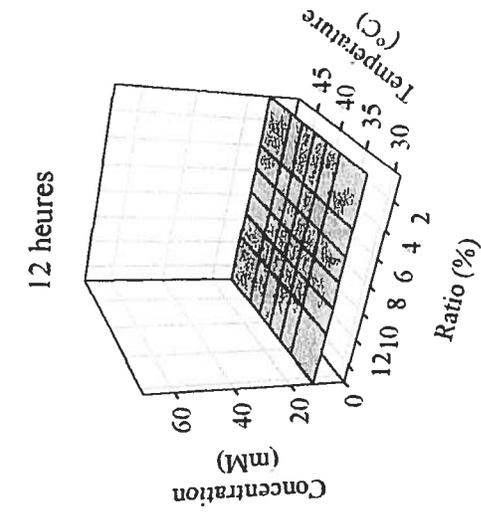


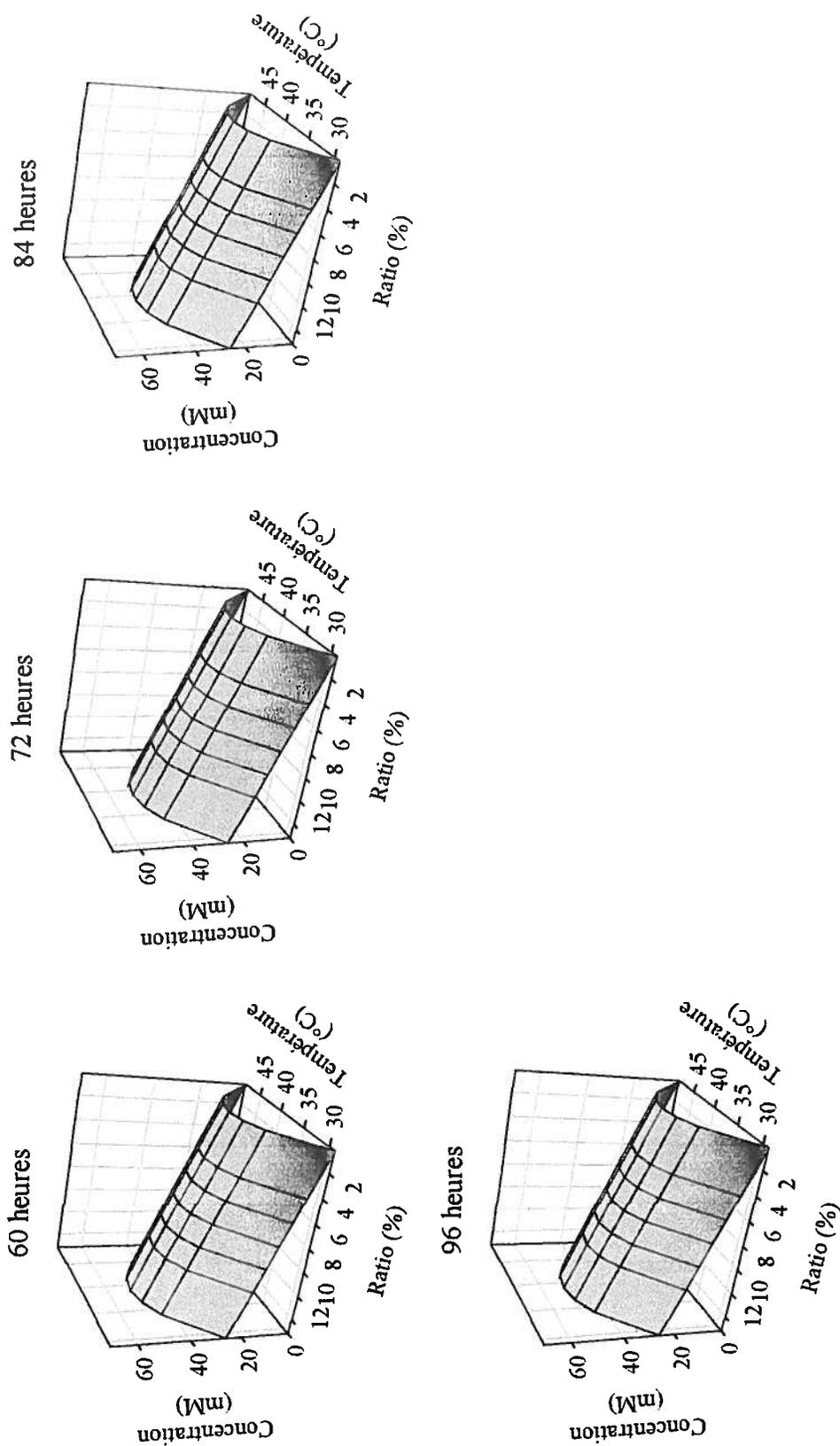
Annexe 3a : Influence combinée de la température (°C) et du pH sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.





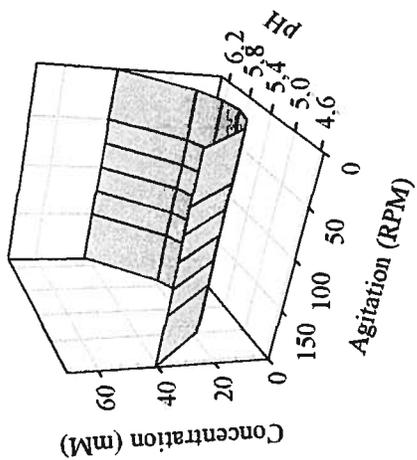
Annexe 3b : Influence combinée de la température (°C) et de l'agitation (rpm) sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.



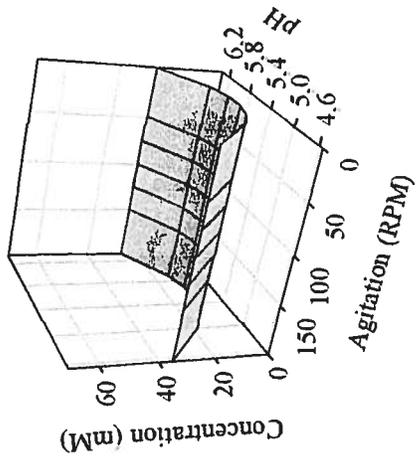


Annexe 3c : Influence combinée de la température (°C) et du ratio d'inoculation (%) sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.

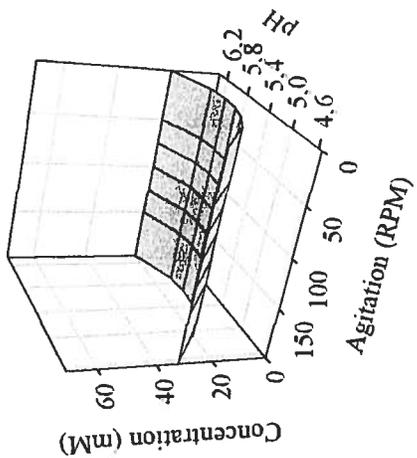
0 heure



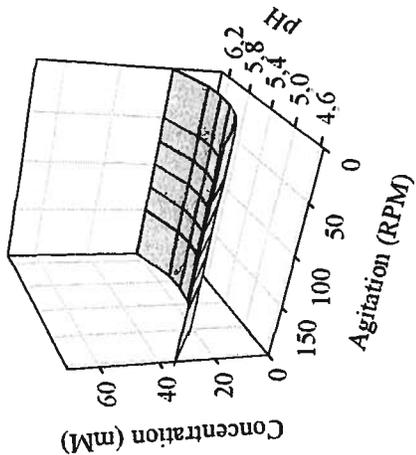
1 heure



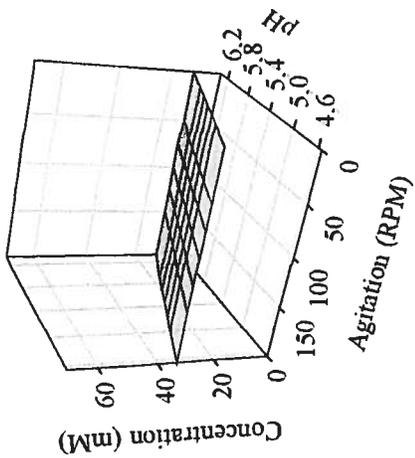
12 heures



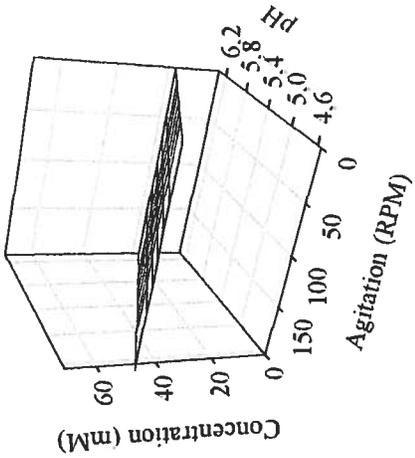
24 heures

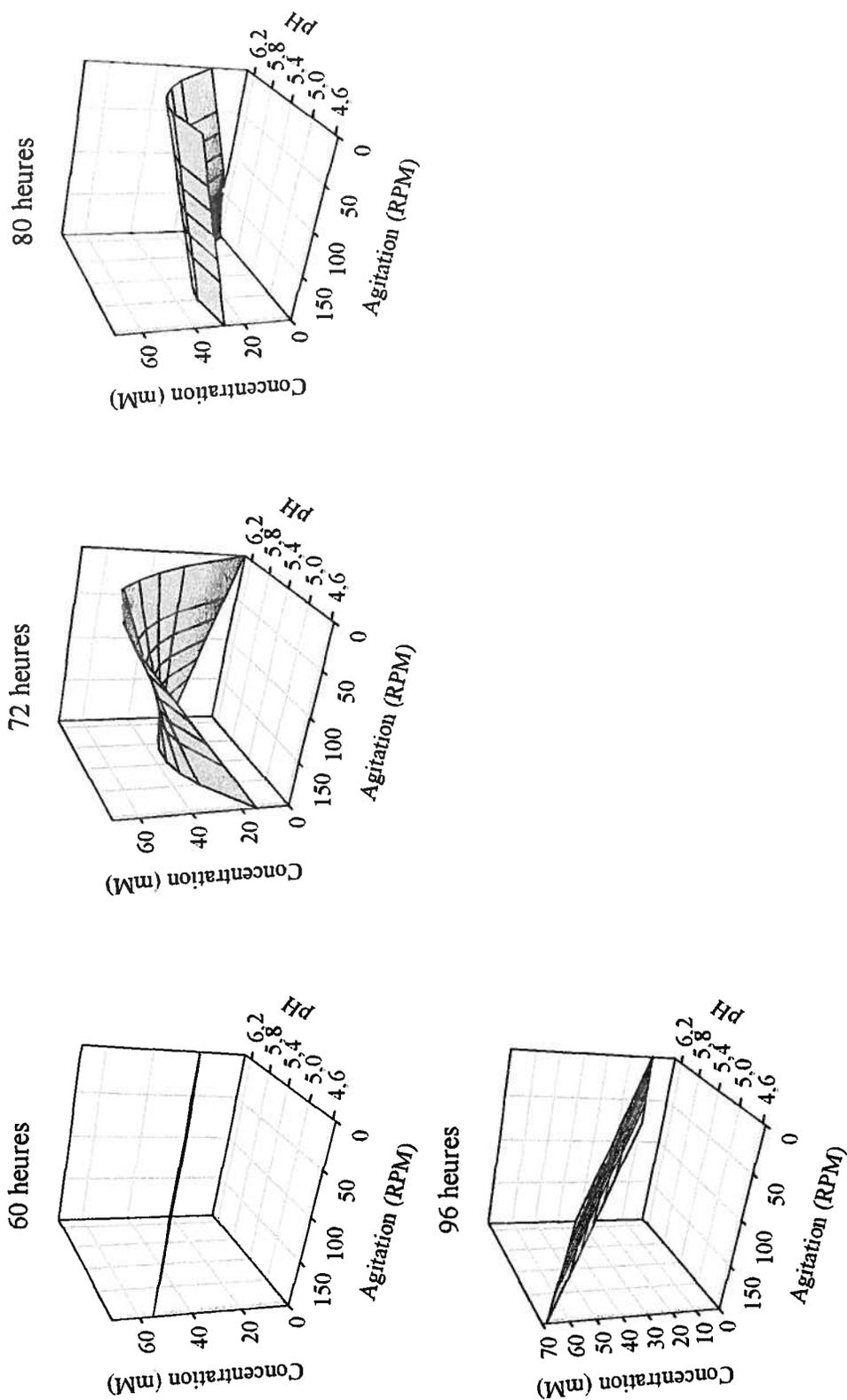


36 heures

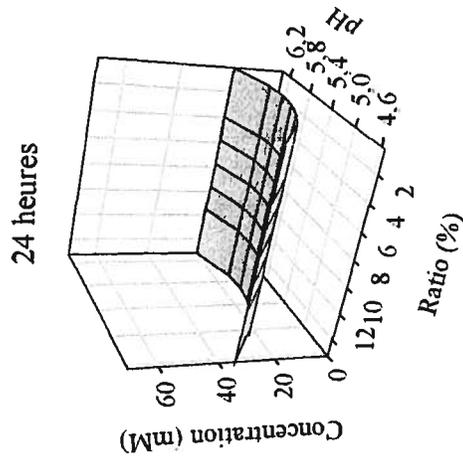
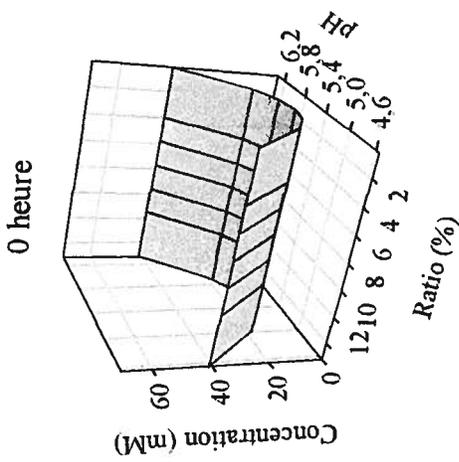
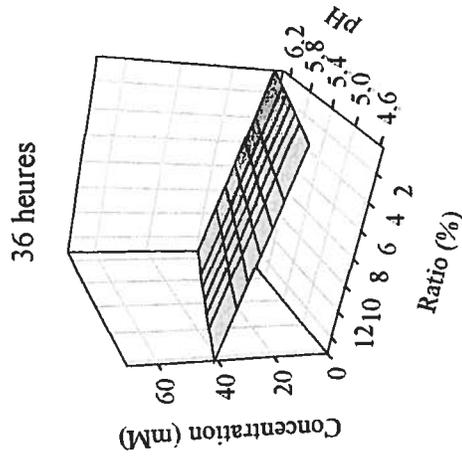
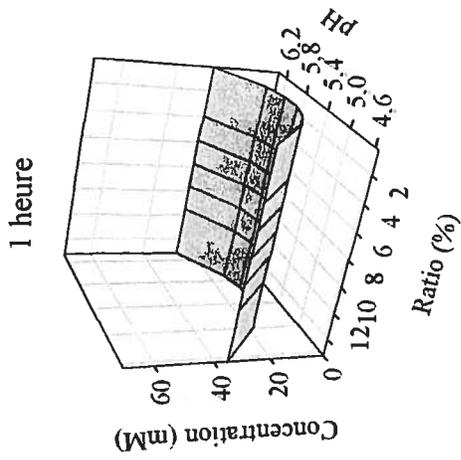
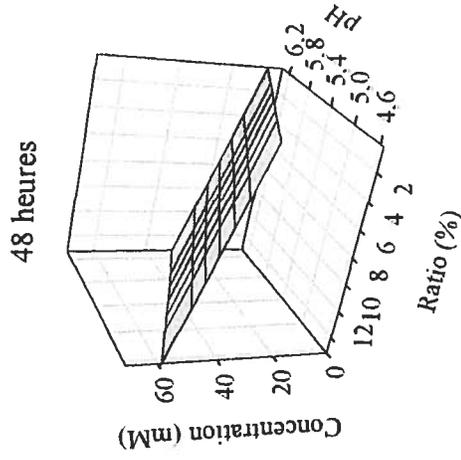
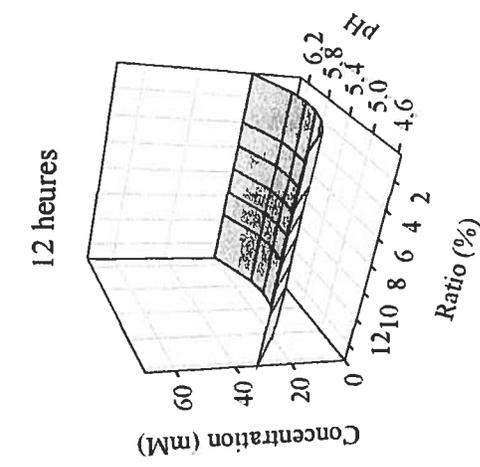


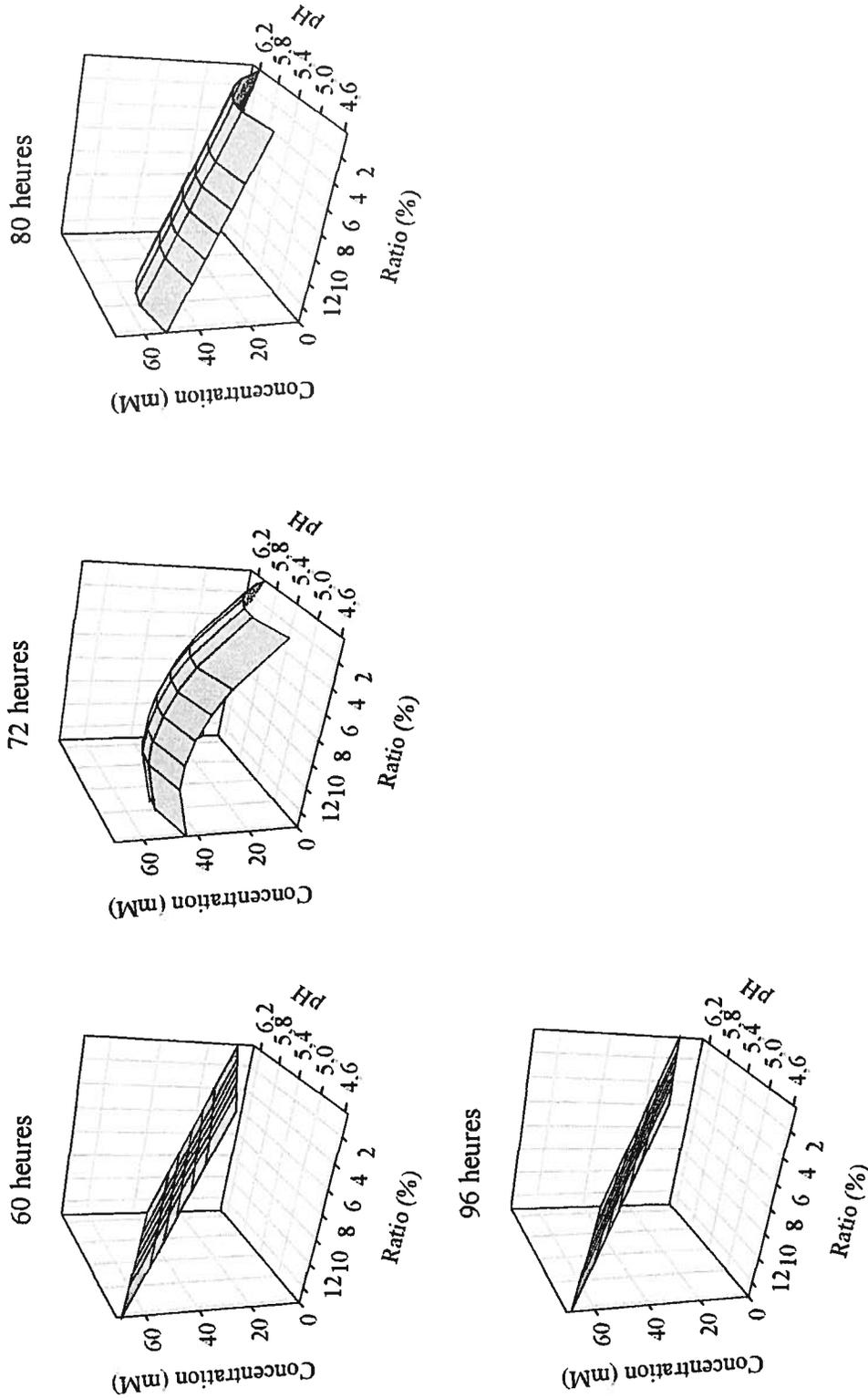
48 heures



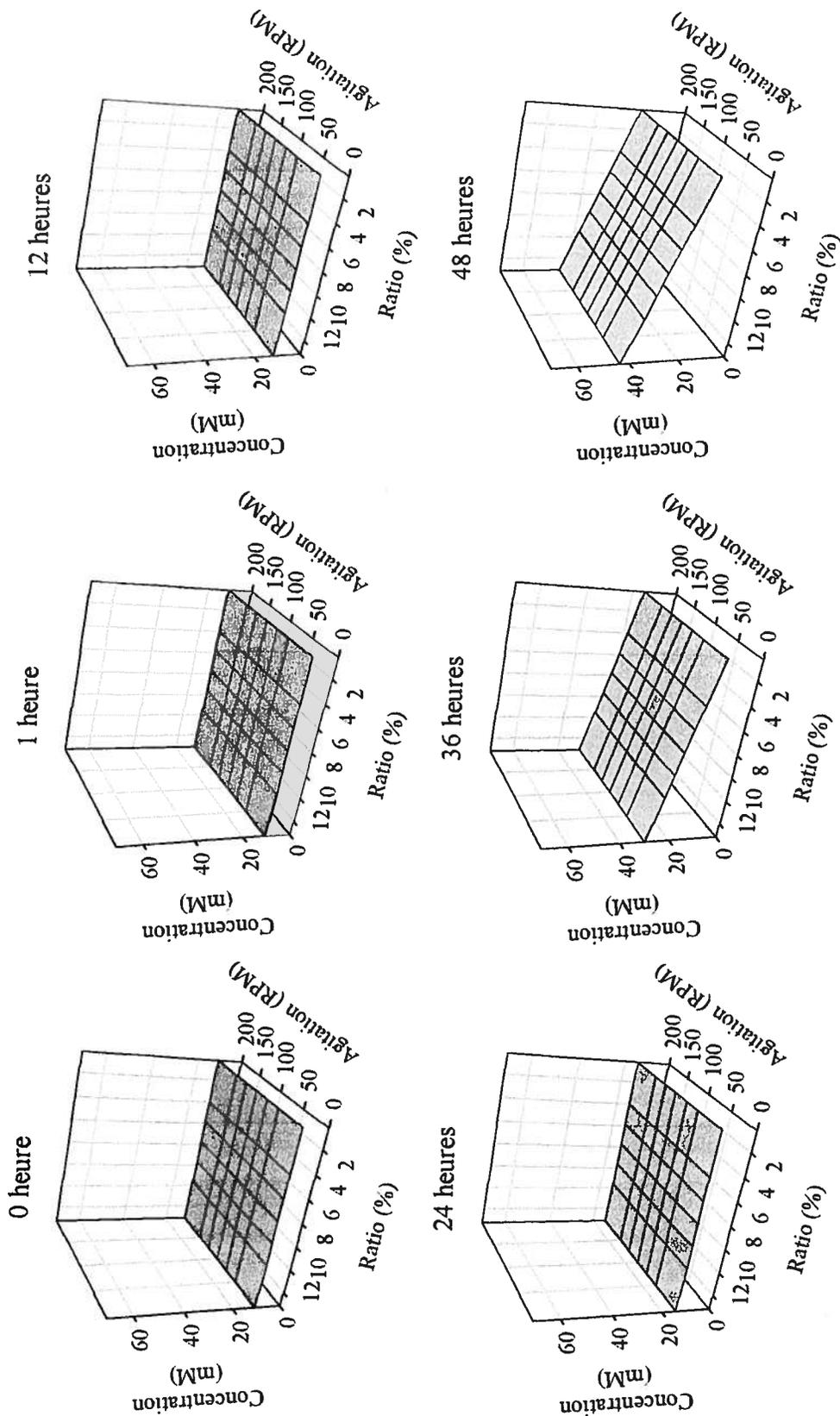


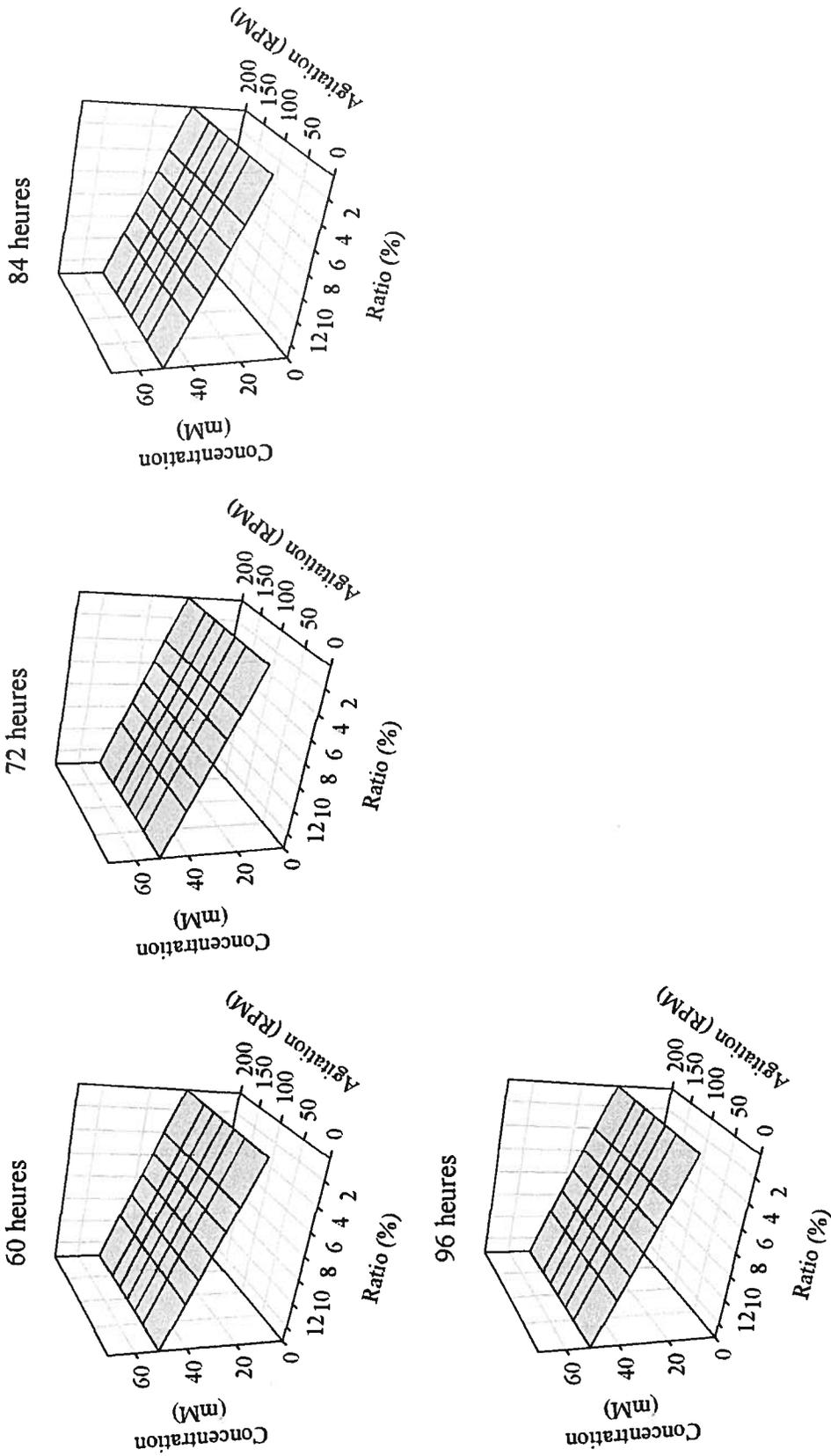
Annexe 3d : Influence combinée du pH et de l'agitation (rpm) sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.





Annexe 3e : Influence combinée du pH et du ratio d'inoculation (%) sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.



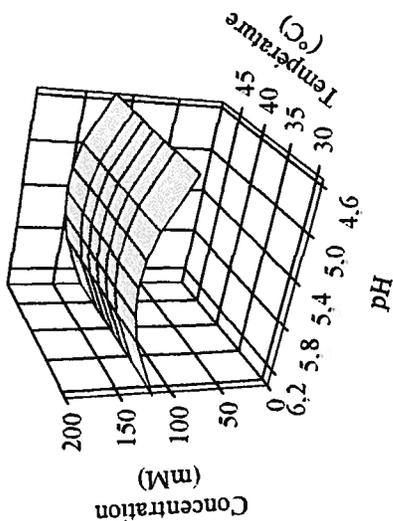


Annexe 3f : Influence combinée de l'agitation (rpm) et du ratio d'inoculation (%) sur la production de d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) avec un degré de tolérance de $p \leq 0,10$.

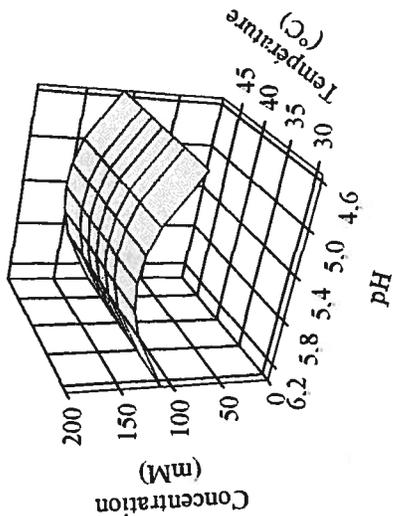
ANNEXE 4

L'annexe 4 regroupe tous les graphiques des interactions du premier degré entre les variables explicatives pour les études portant sur l'utilisation du lactose.

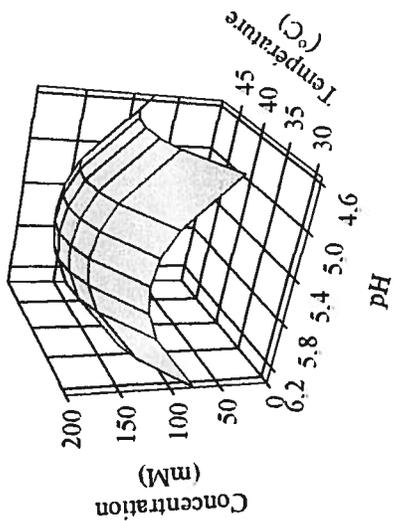
0 heure



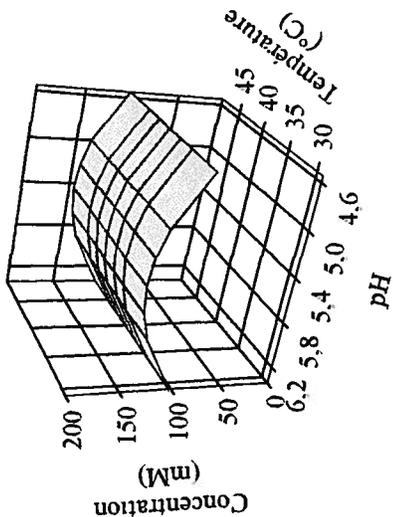
1 heure



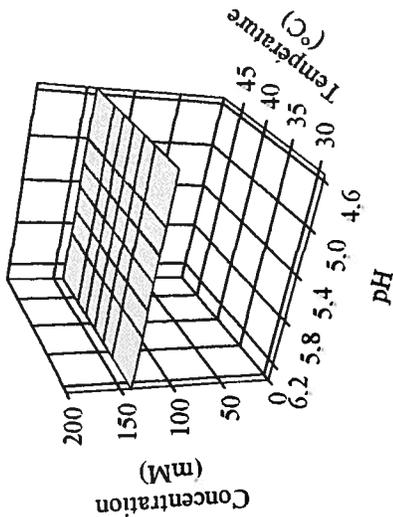
12 heures



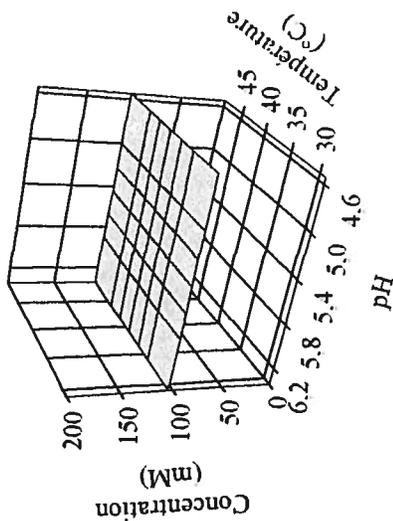
24 heures

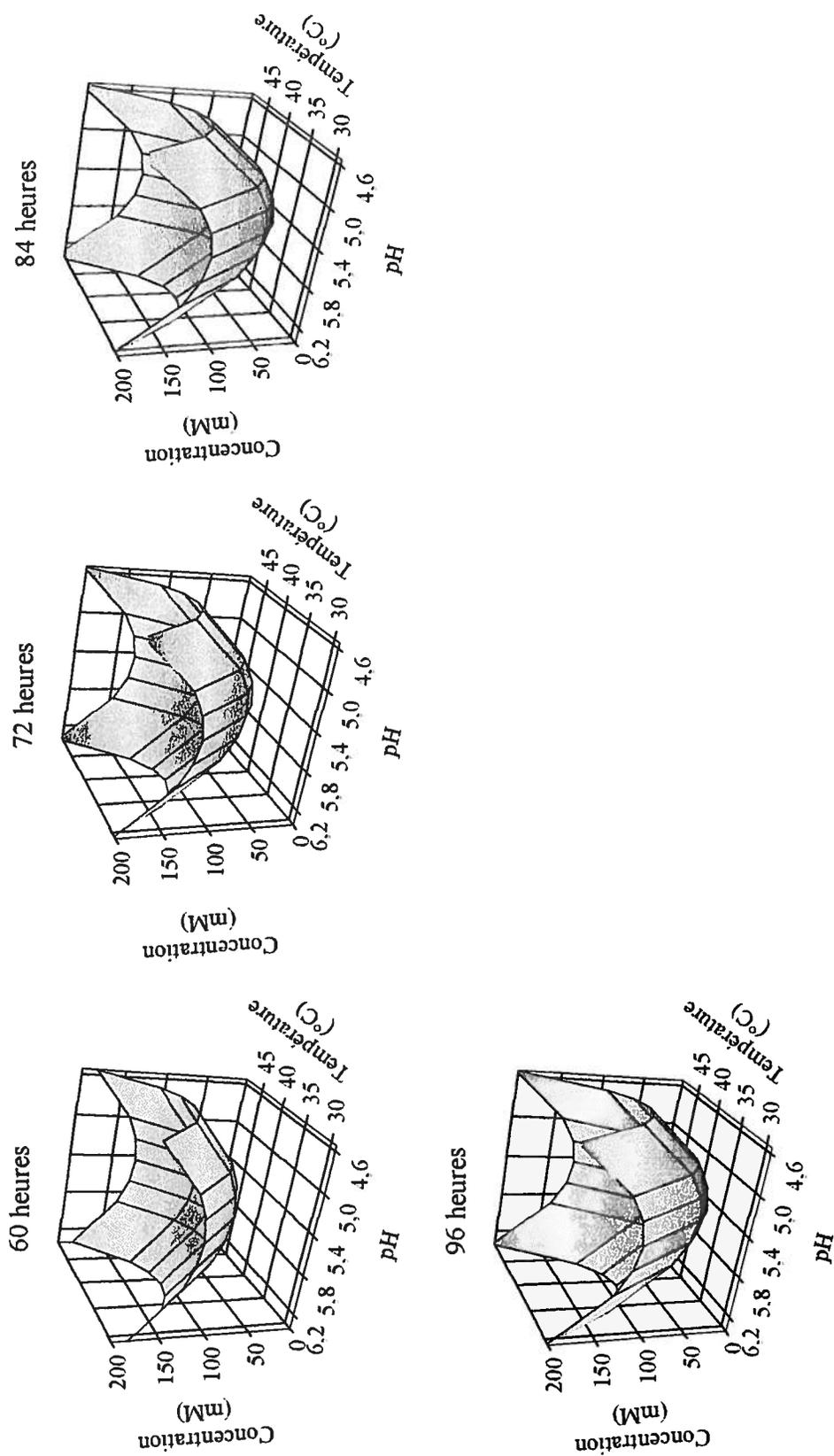


36 heures

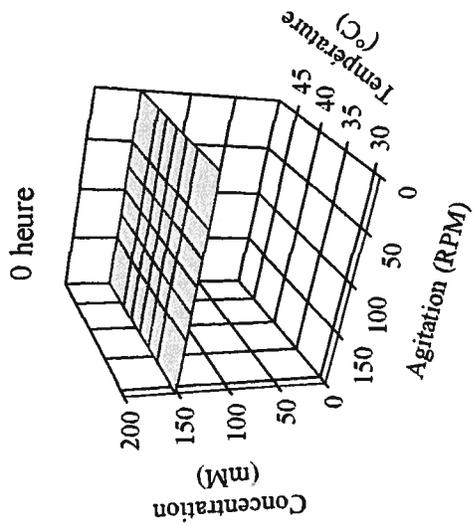
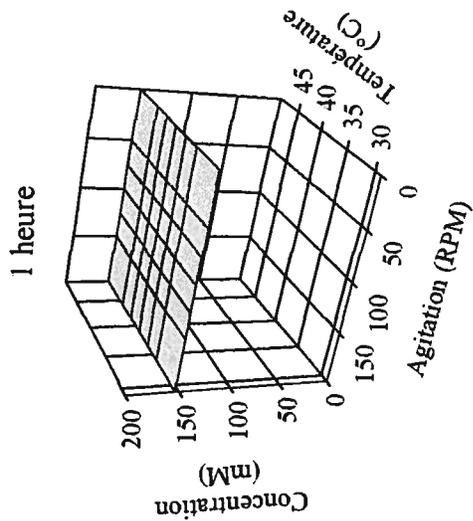
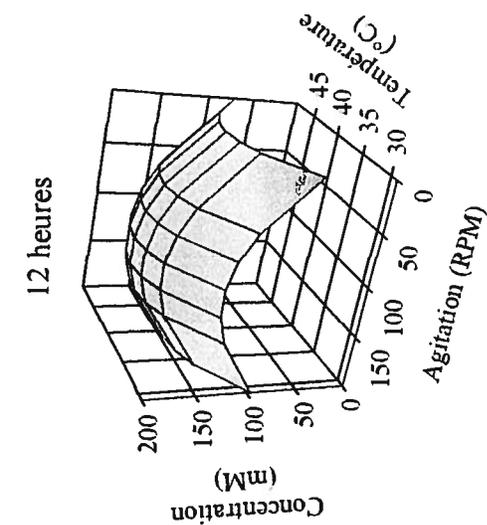


48 heures

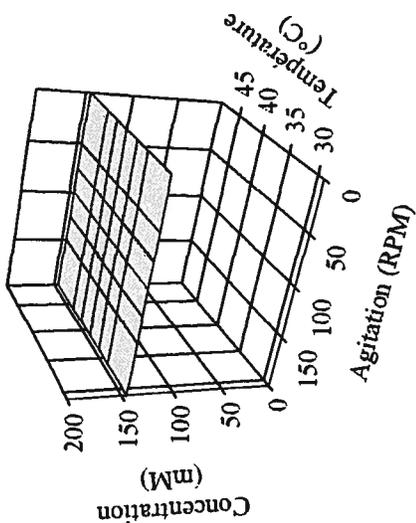




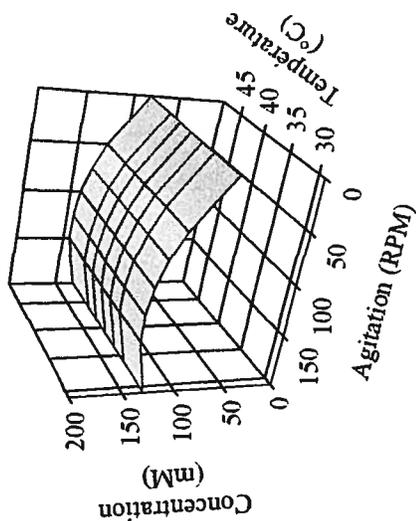
Annexe 4a : Influence combinée de la température (°C) et du pH sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



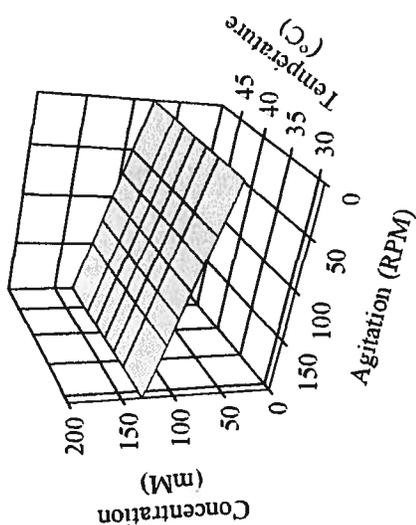
24 heures

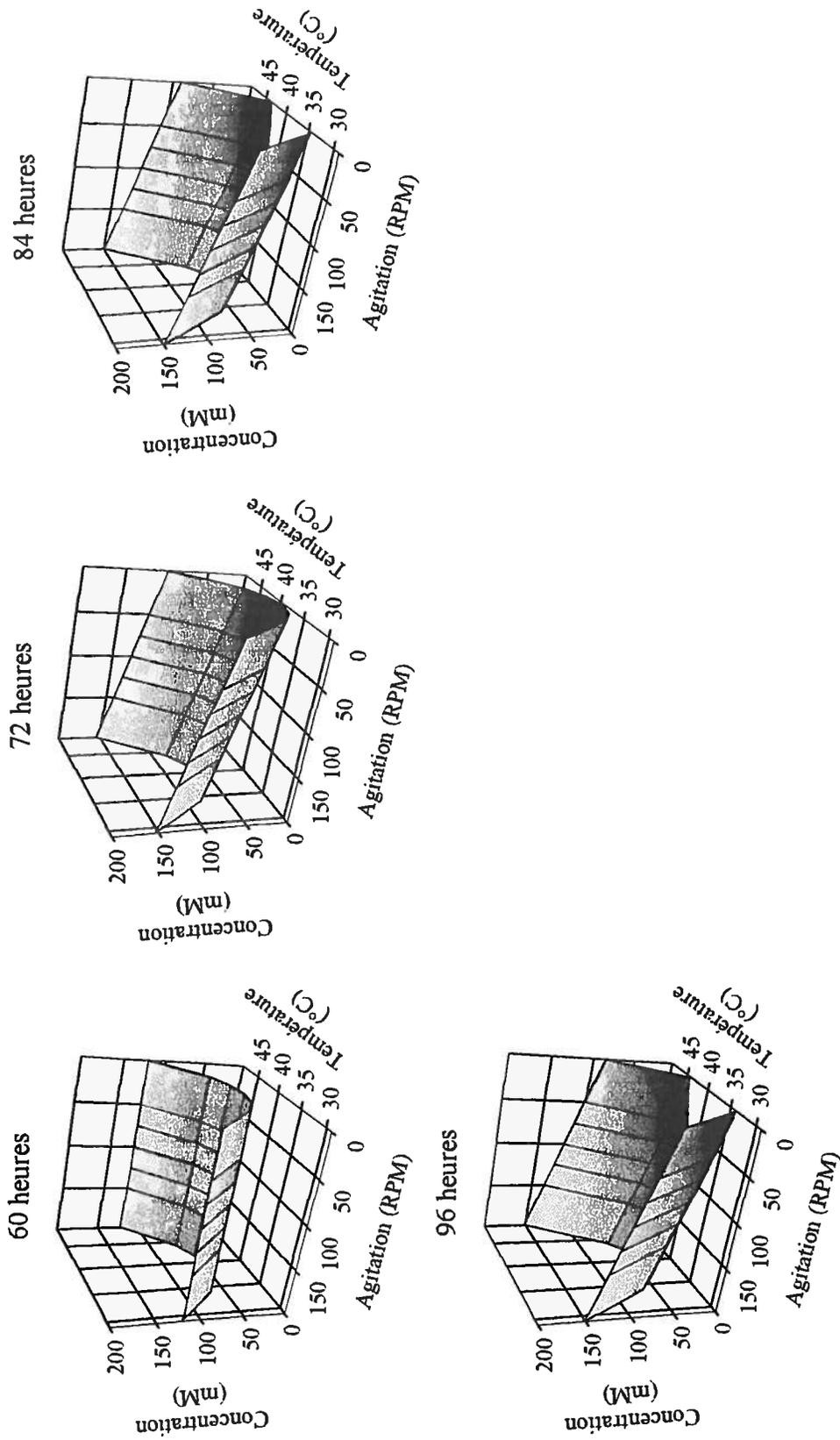


36 heures

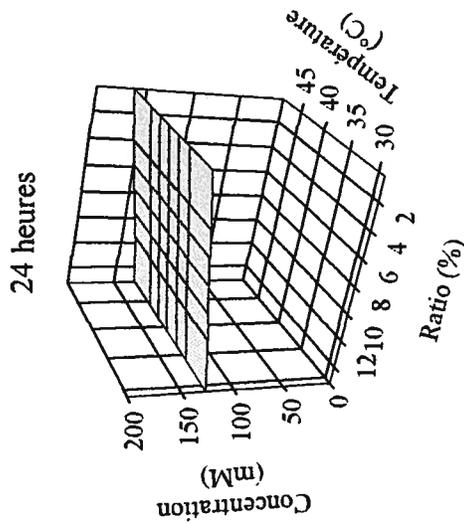
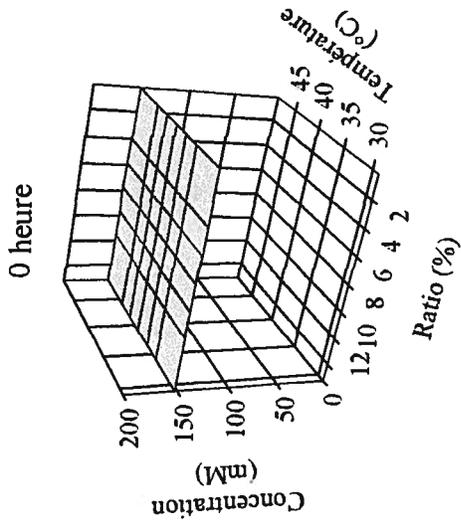
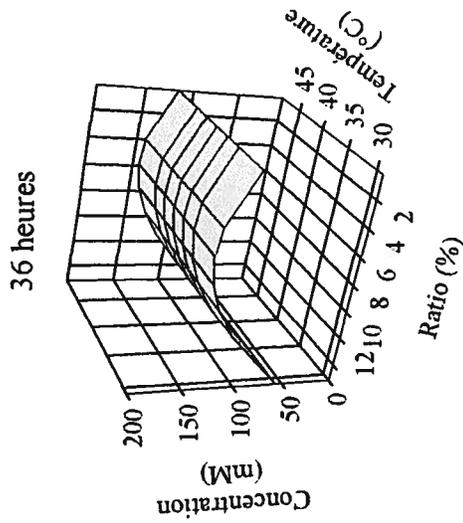
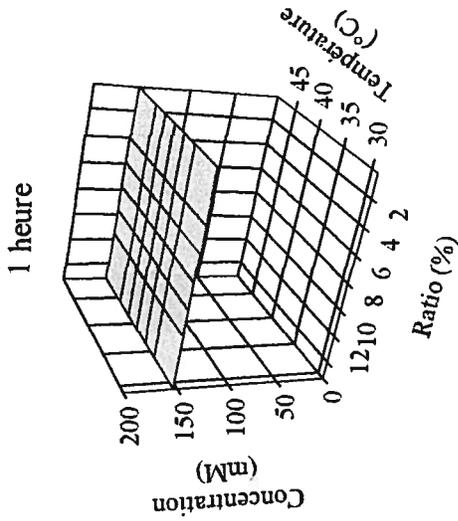
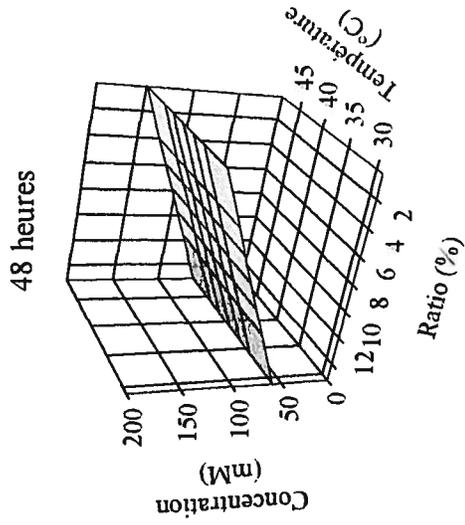
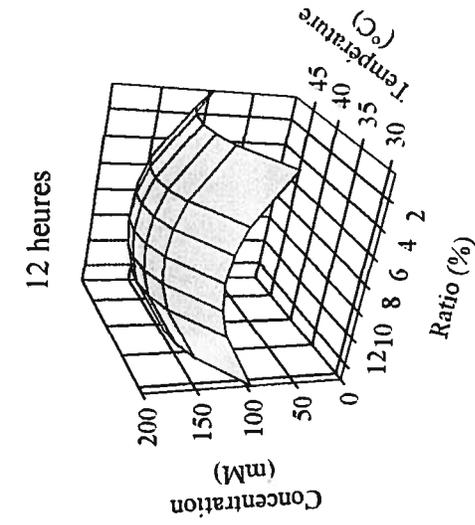


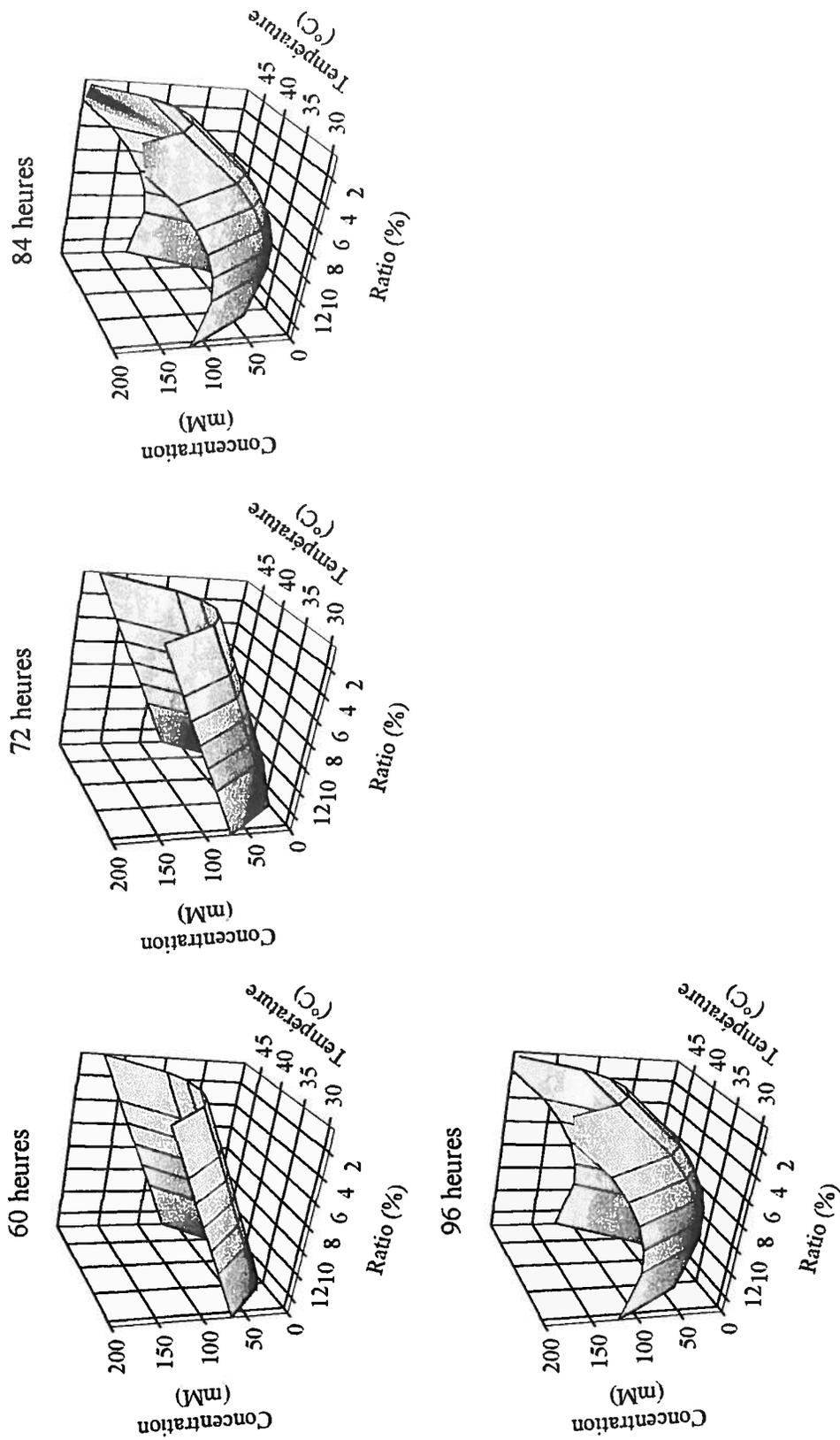
48 heures



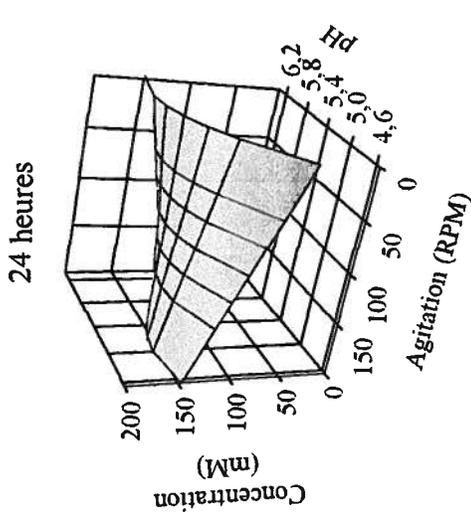
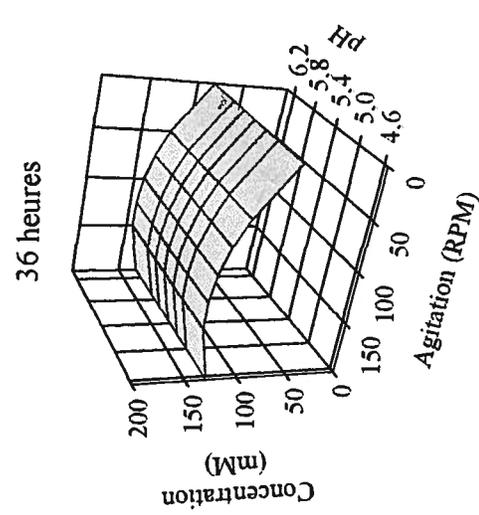
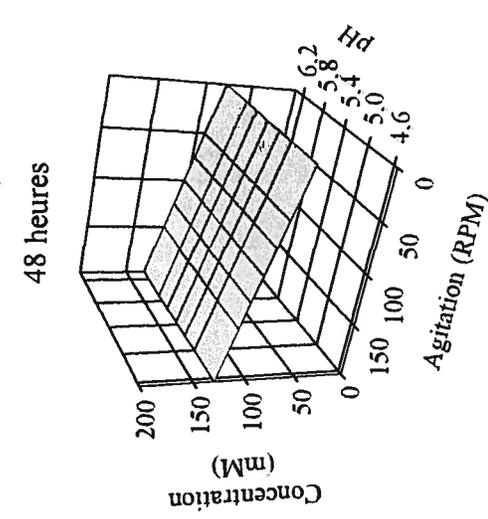
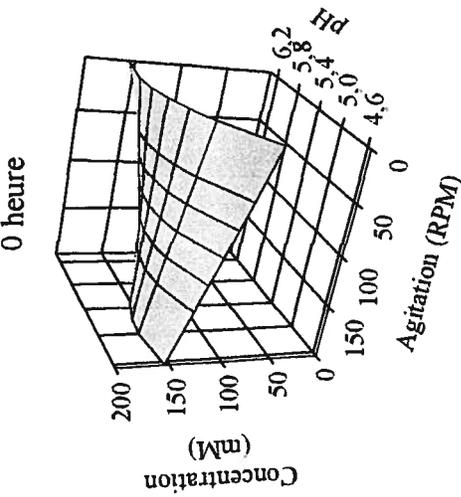
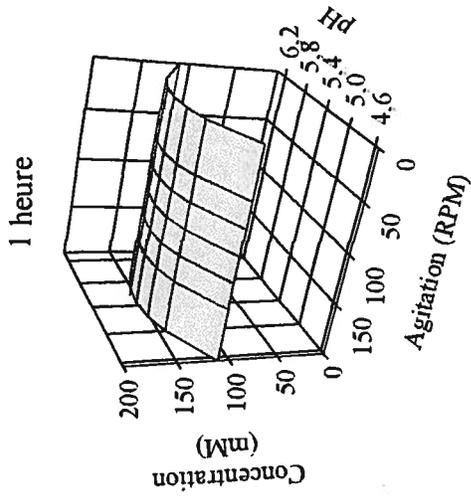
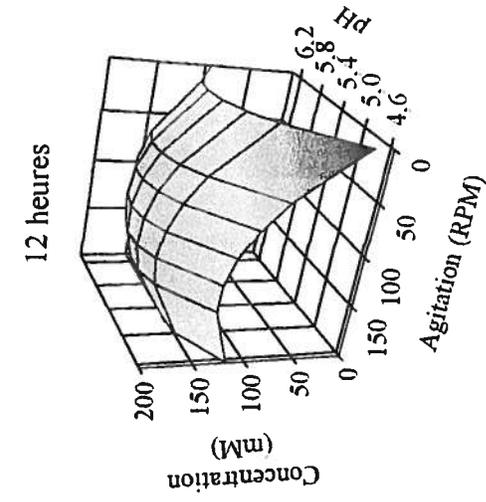


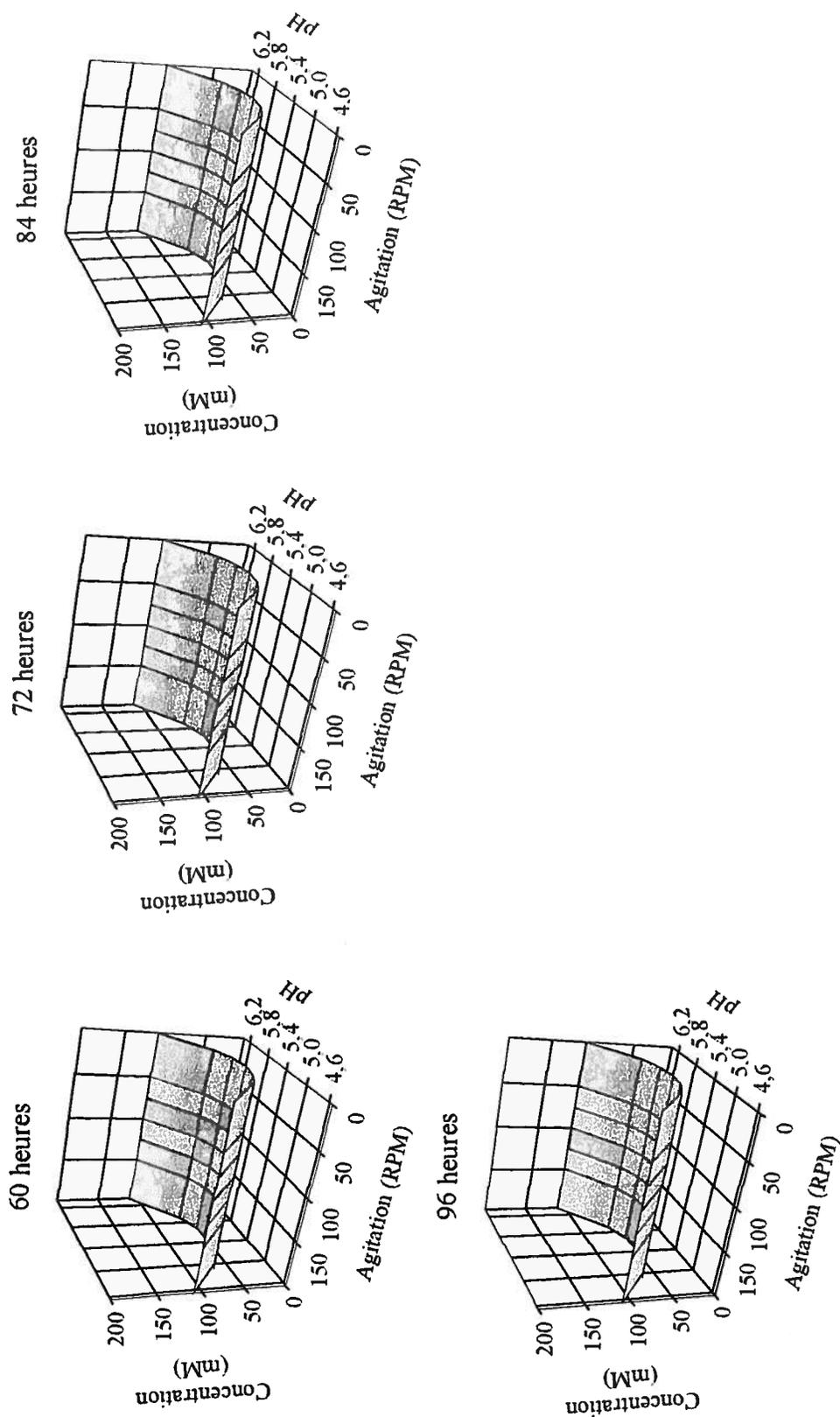
Annexe 4b : Influence combinée de la température (°C) et de l'agitation (rpm) sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



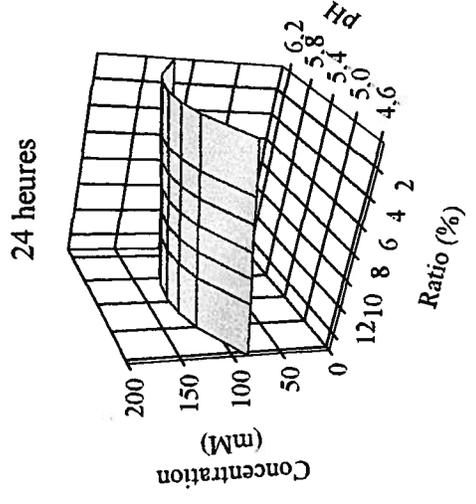
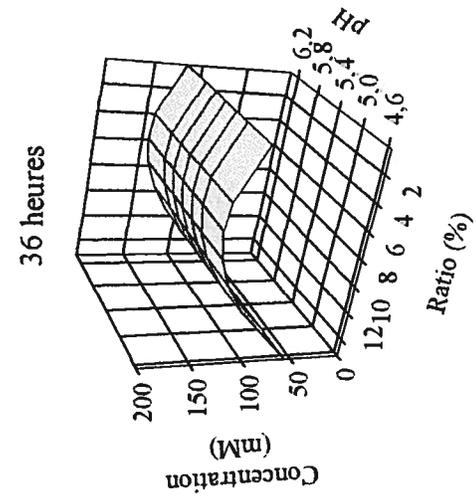
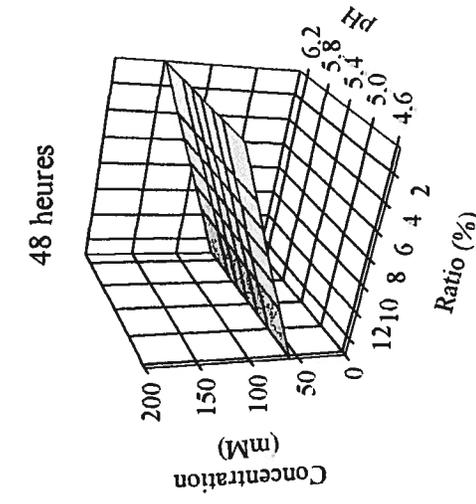
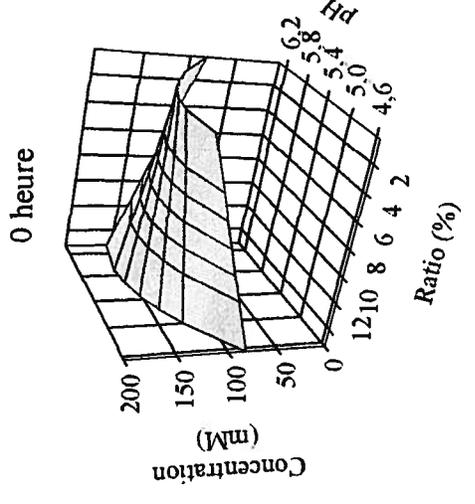
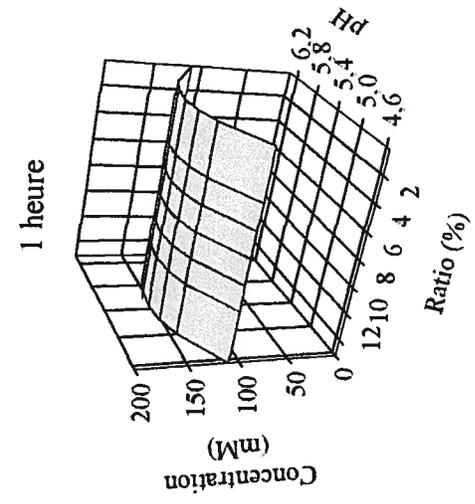
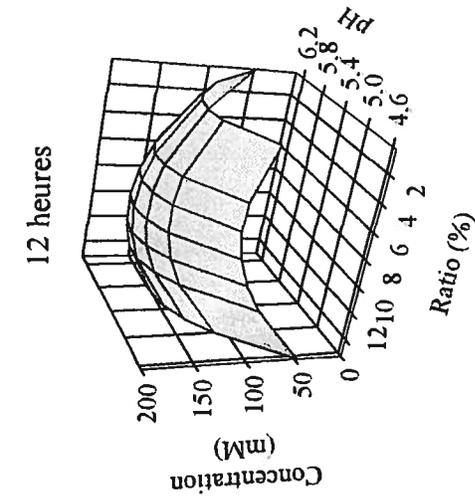


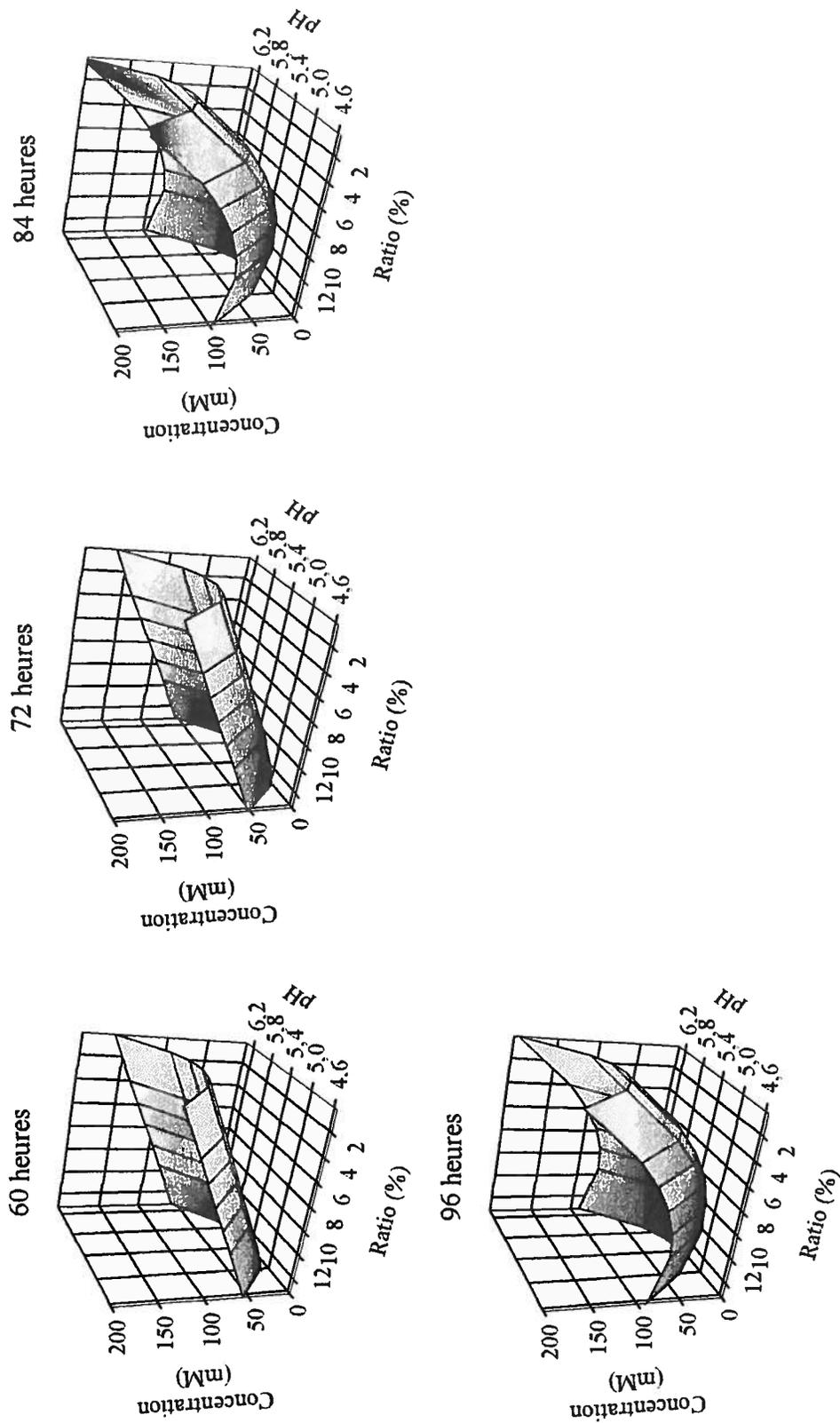
Annexe 4c : Influence combinée de la température (°C) et du ratio d'inoculation (%) sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



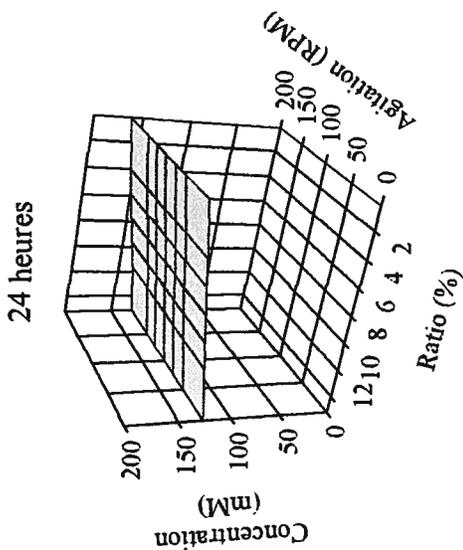
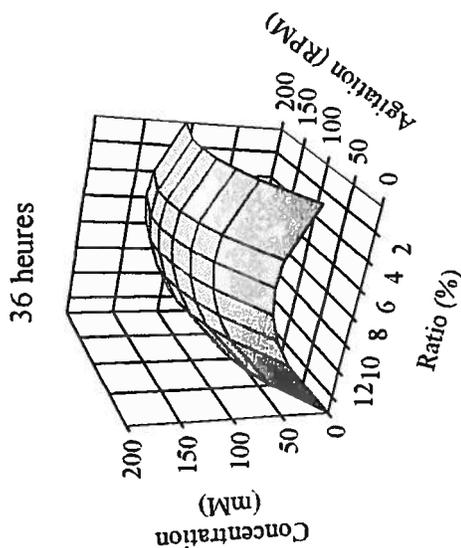
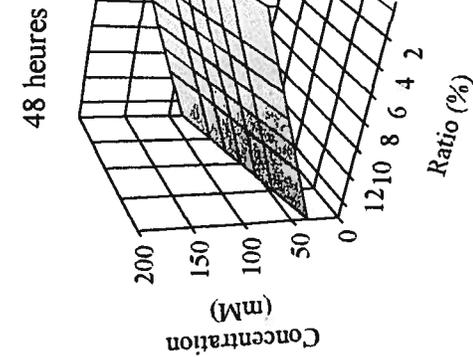
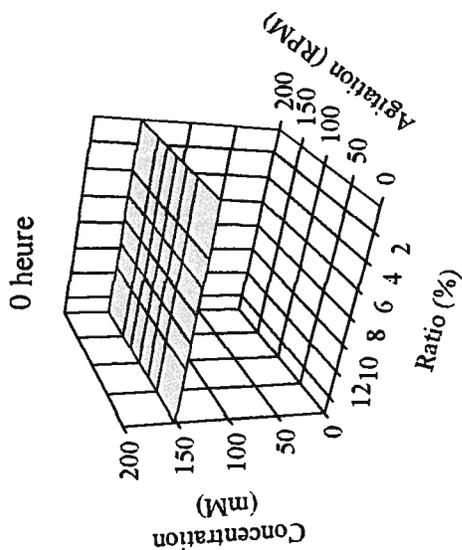
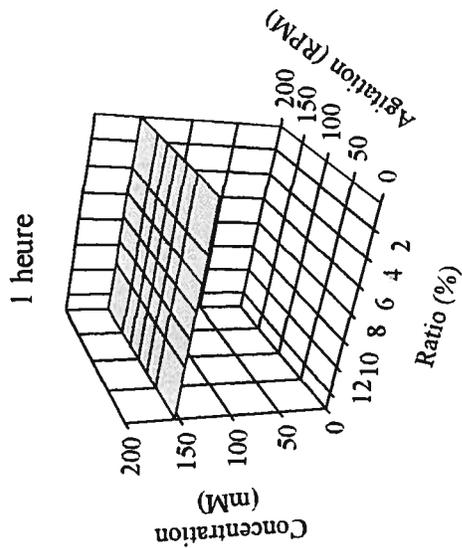
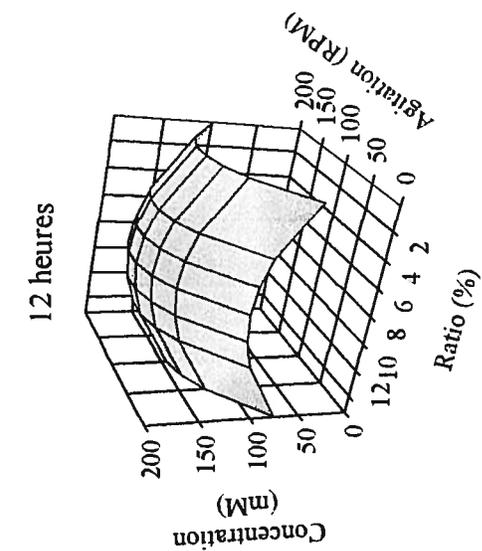


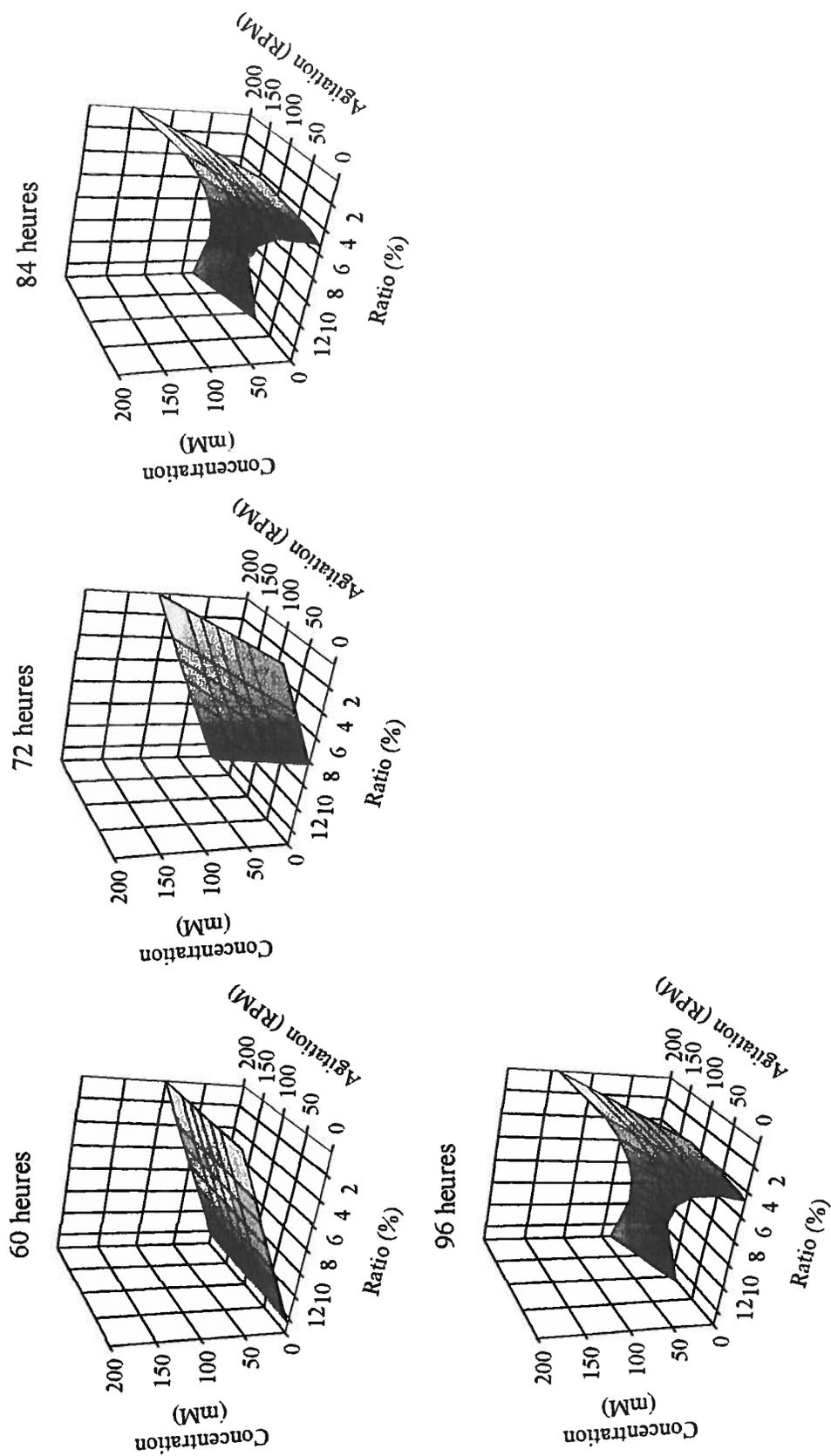
Annexe 4d : Influence combinée du pH et de l'agitation (rpm) sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.





Annexe 4e : Influence combinée du pH et du ratio d'inoculation (%) sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.

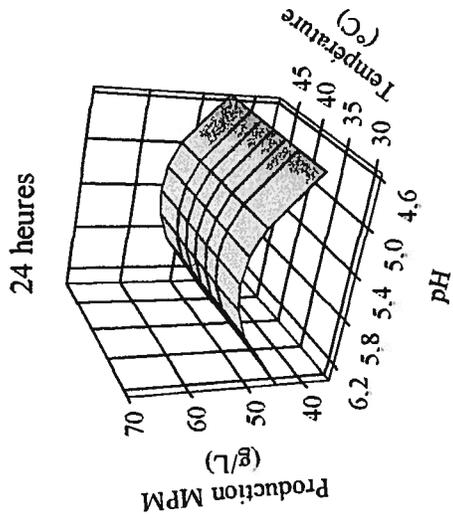
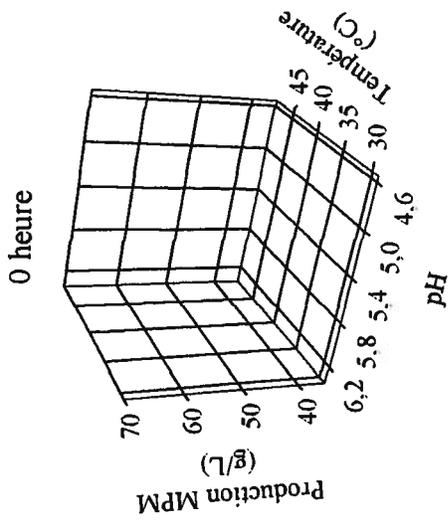
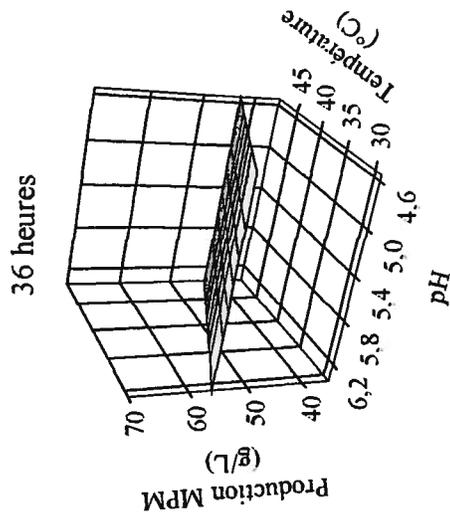
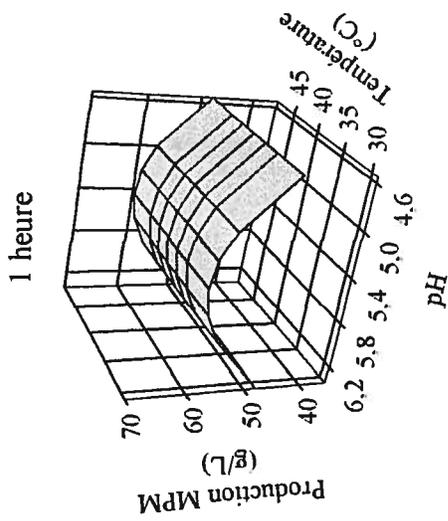
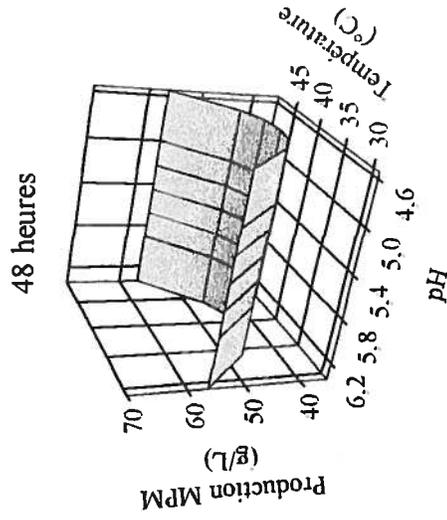
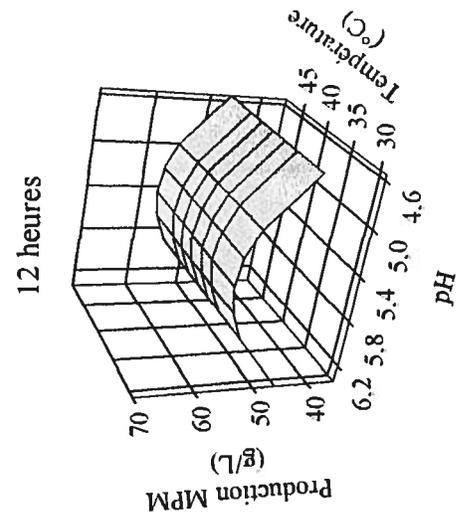


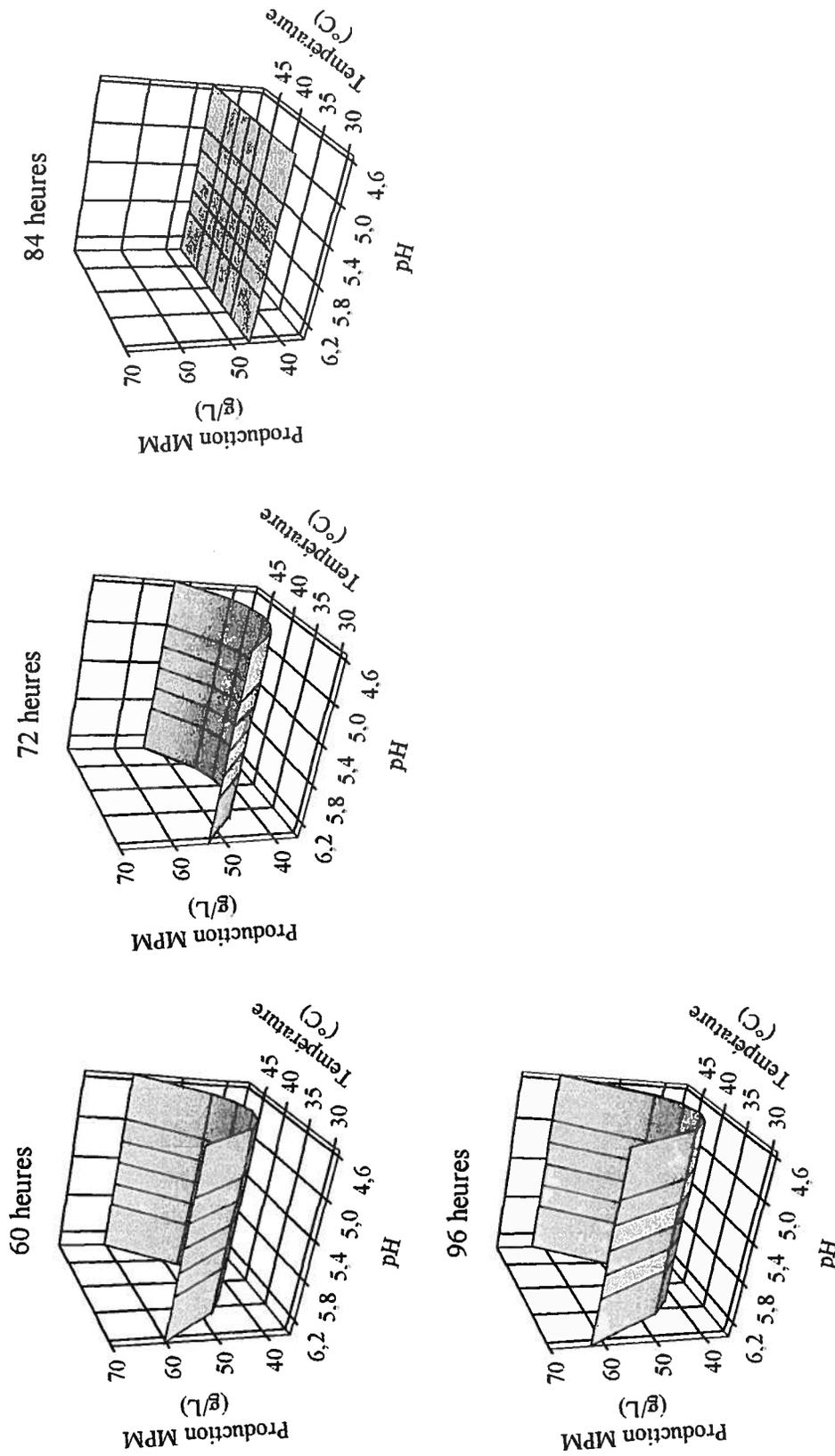


Annexe 4f : Influence combinée de l'agitation (rpm) et ratio d'inoculation (%) sur l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.

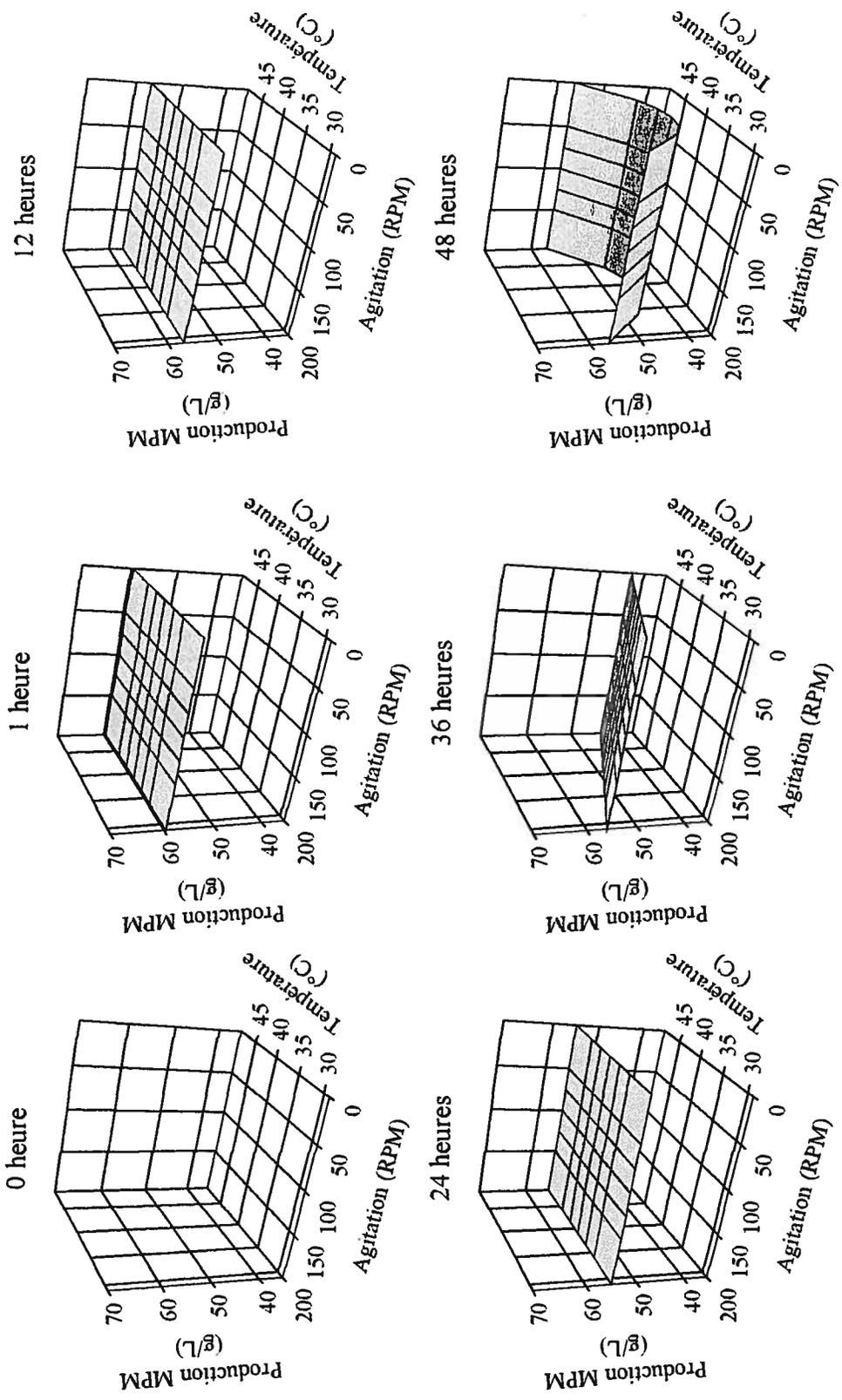
ANNEXE 5

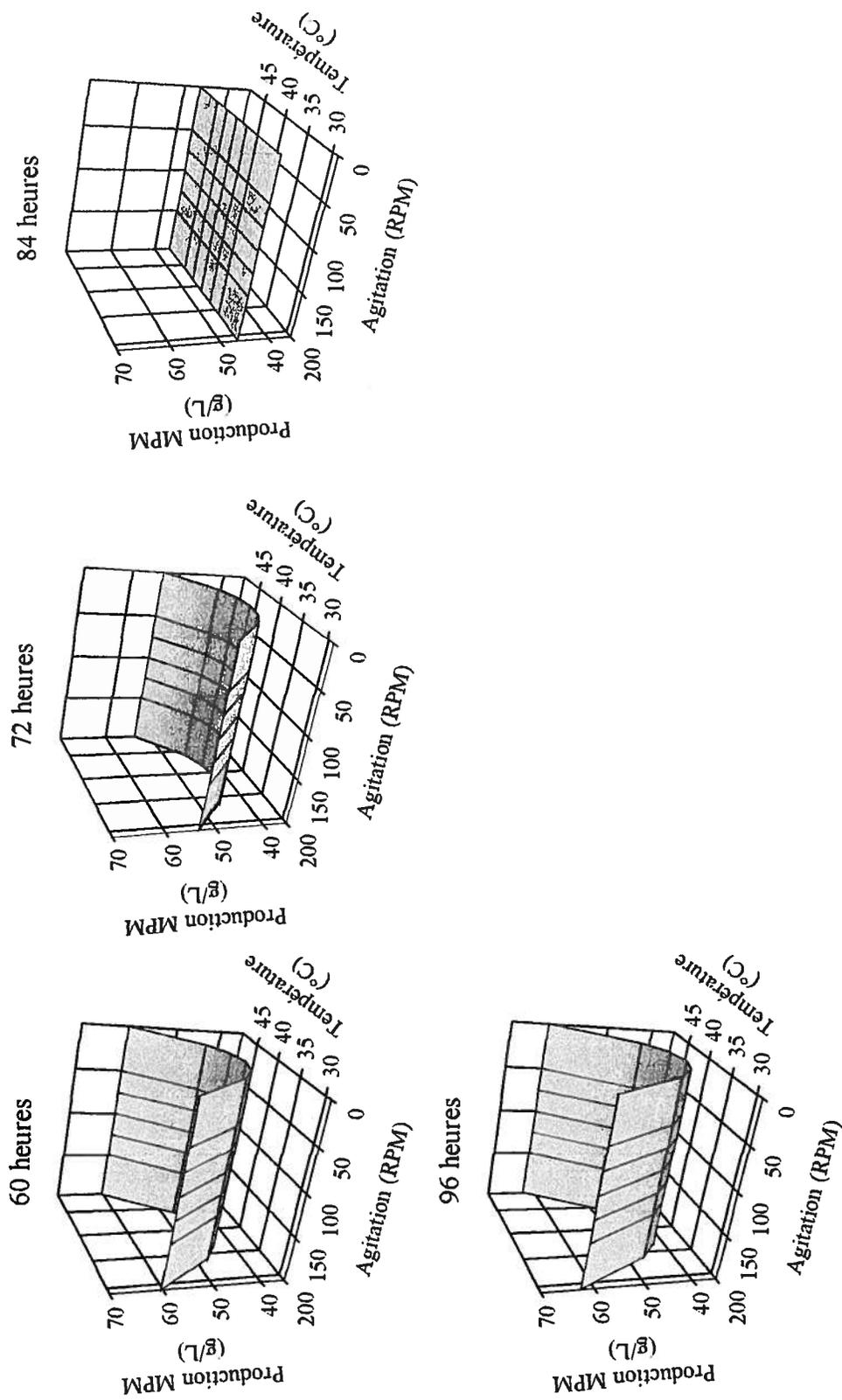
L'annexe 5 regroupe tous les graphiques des interactions du premier degré entre les variables explicatives pour les études portant sur la production de MPM^{mc}.



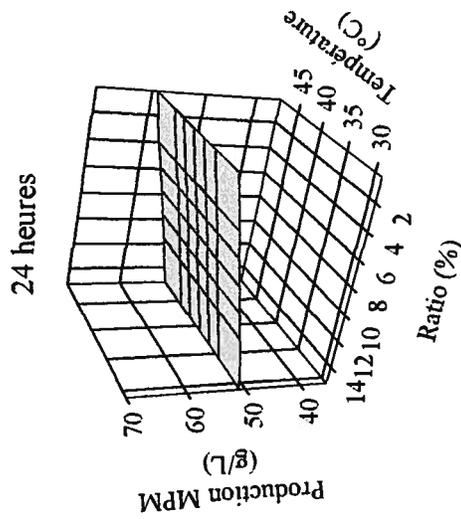
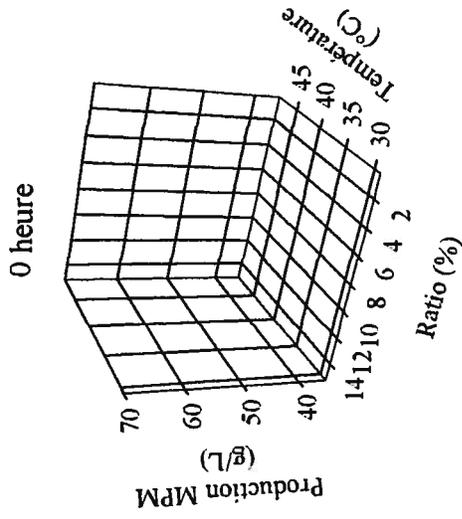
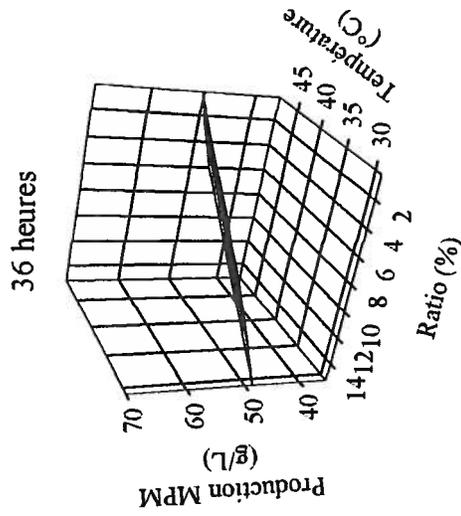
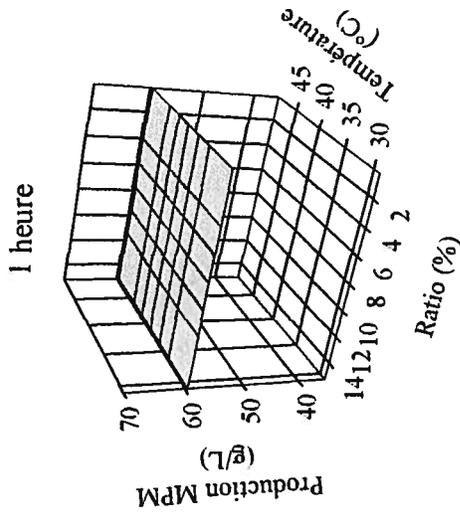
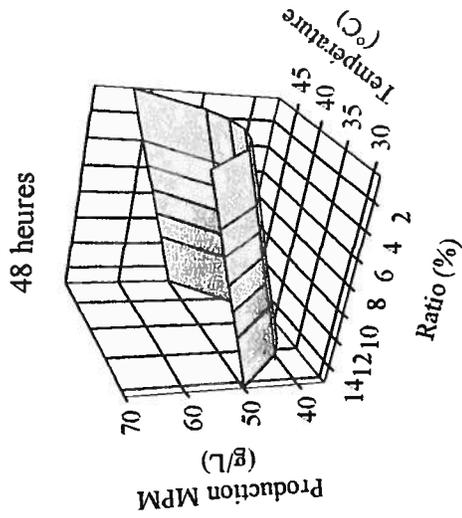
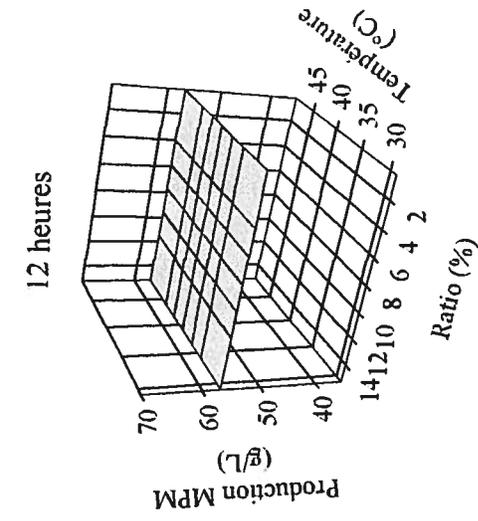


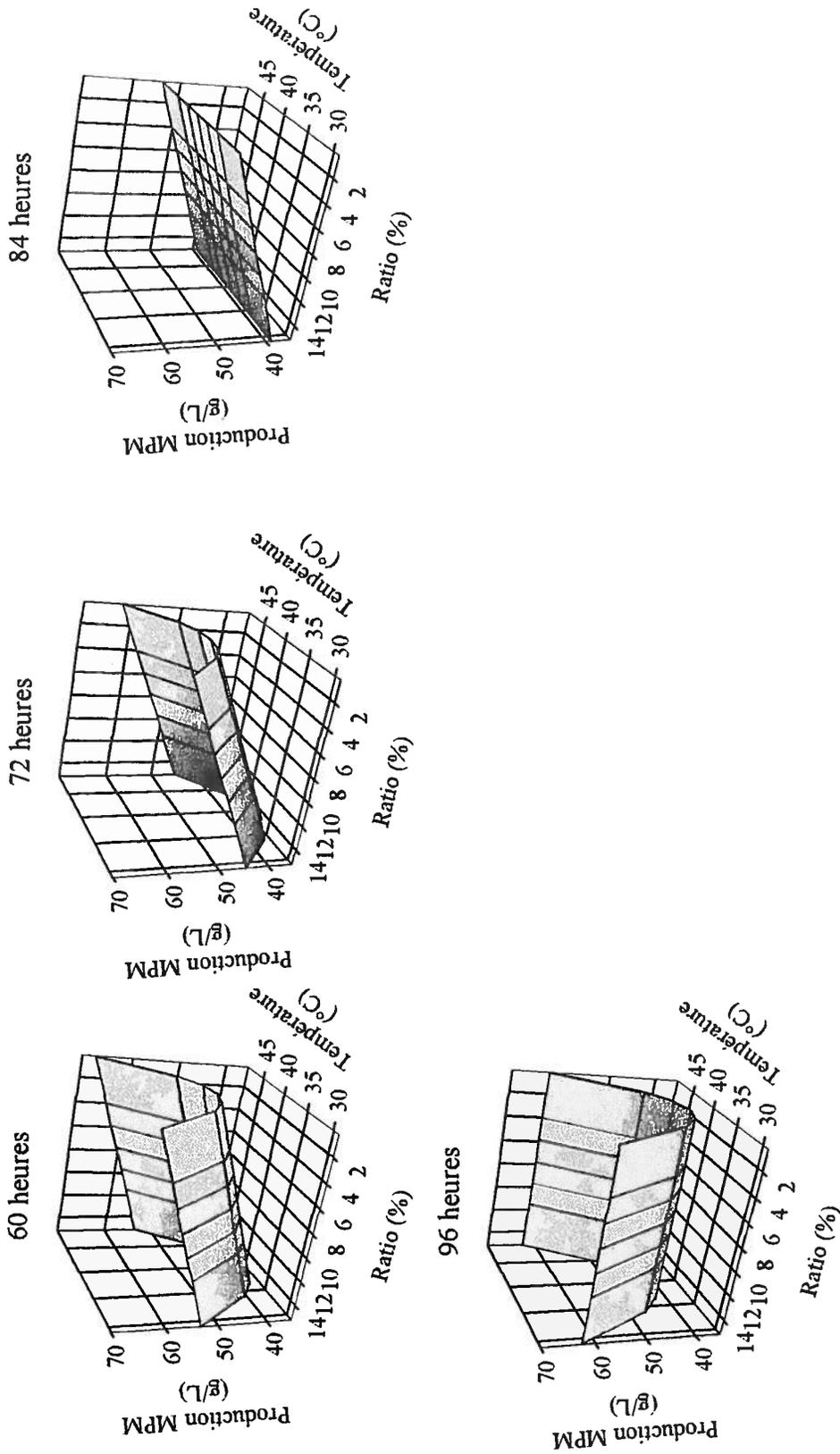
Annexe 5a : Influence combinée de la température (°C) et du pH sur la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



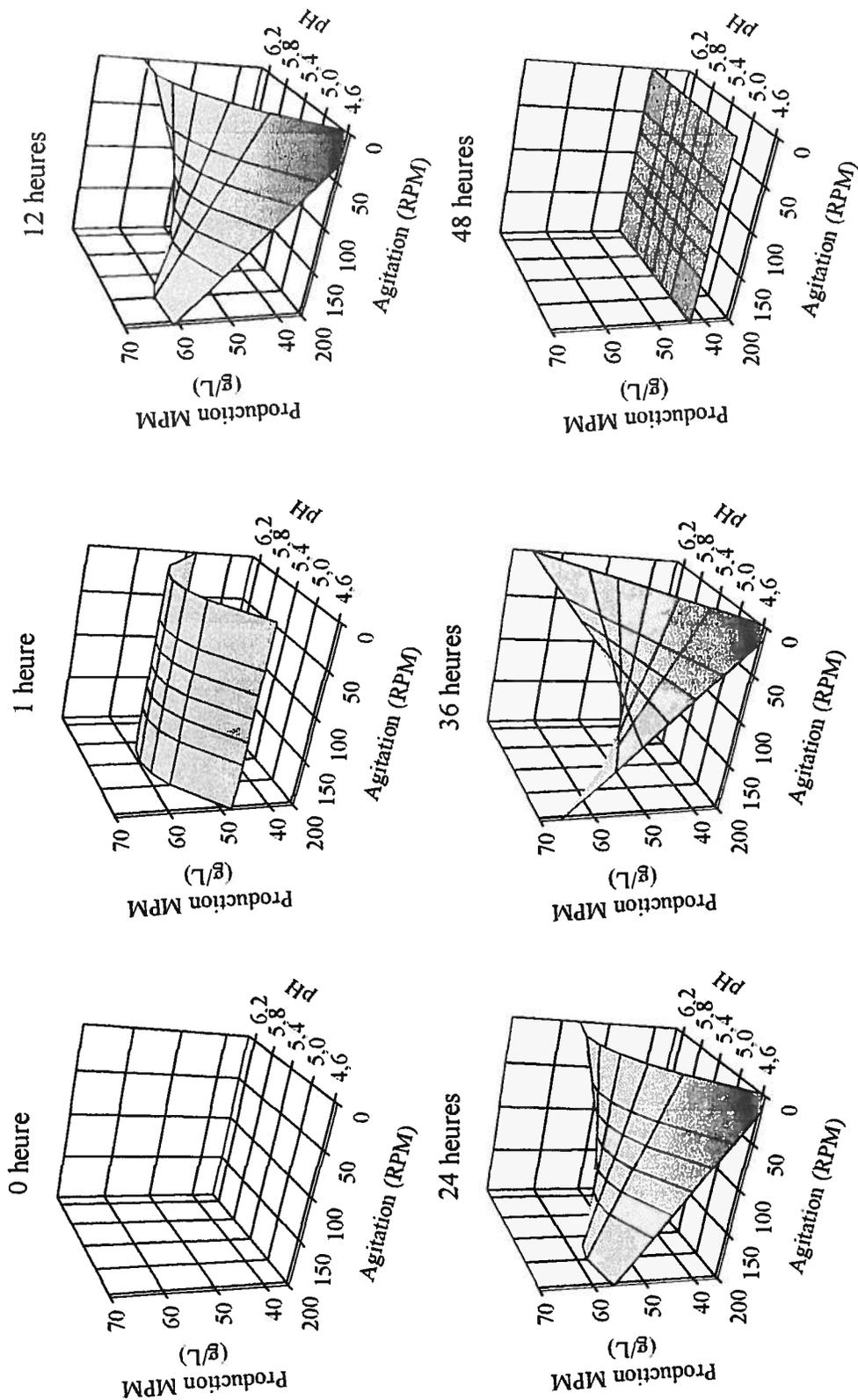


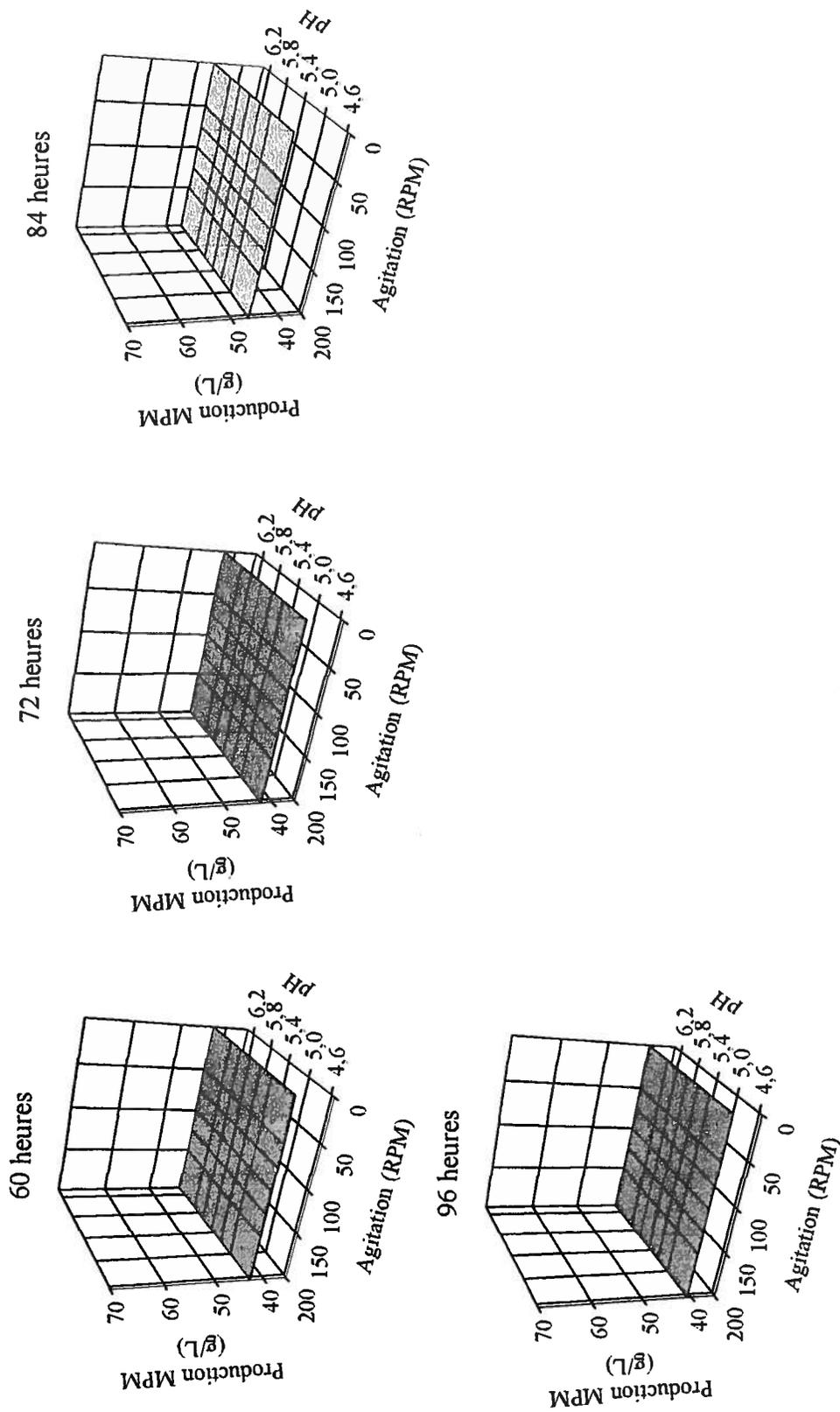
Annexe 5b : Influence combinée de la température (°C) et de l'agitation (rpm) sur la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



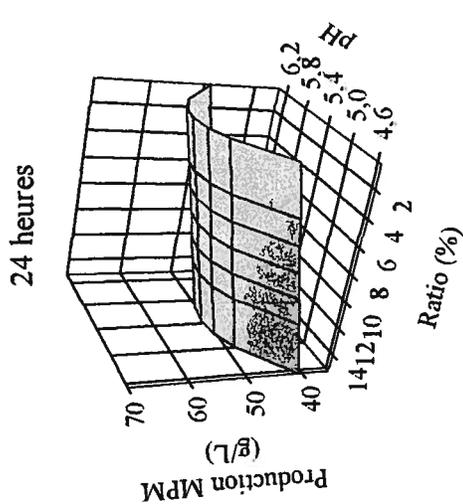
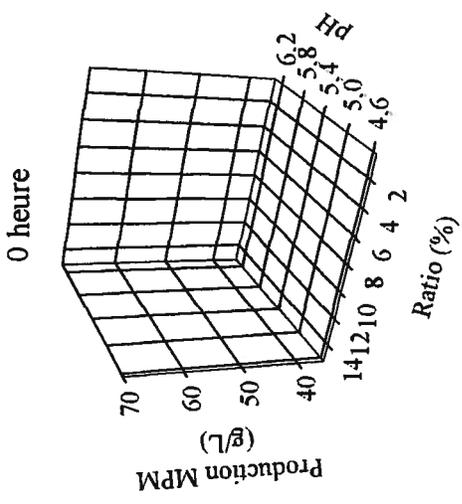
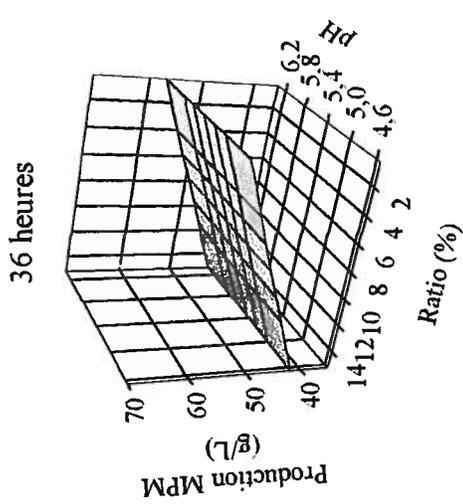
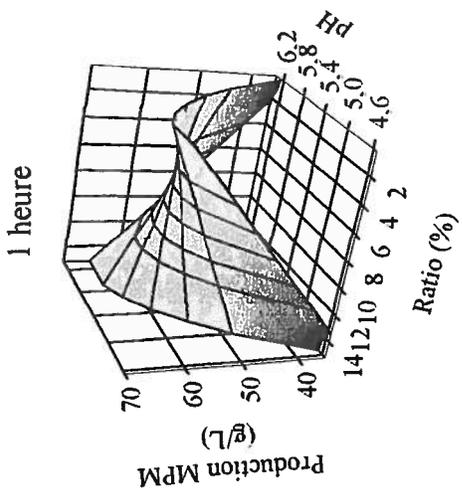
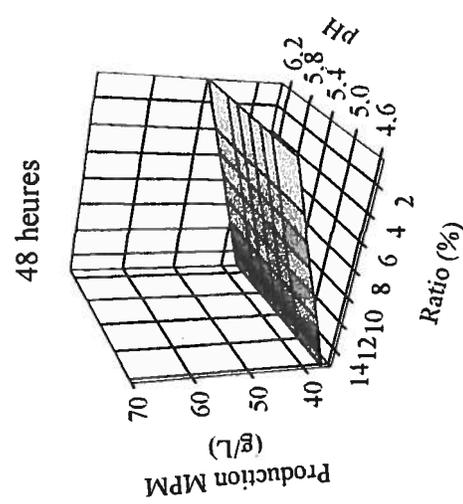
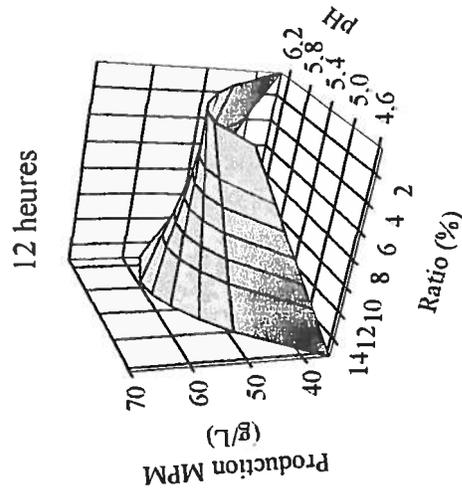


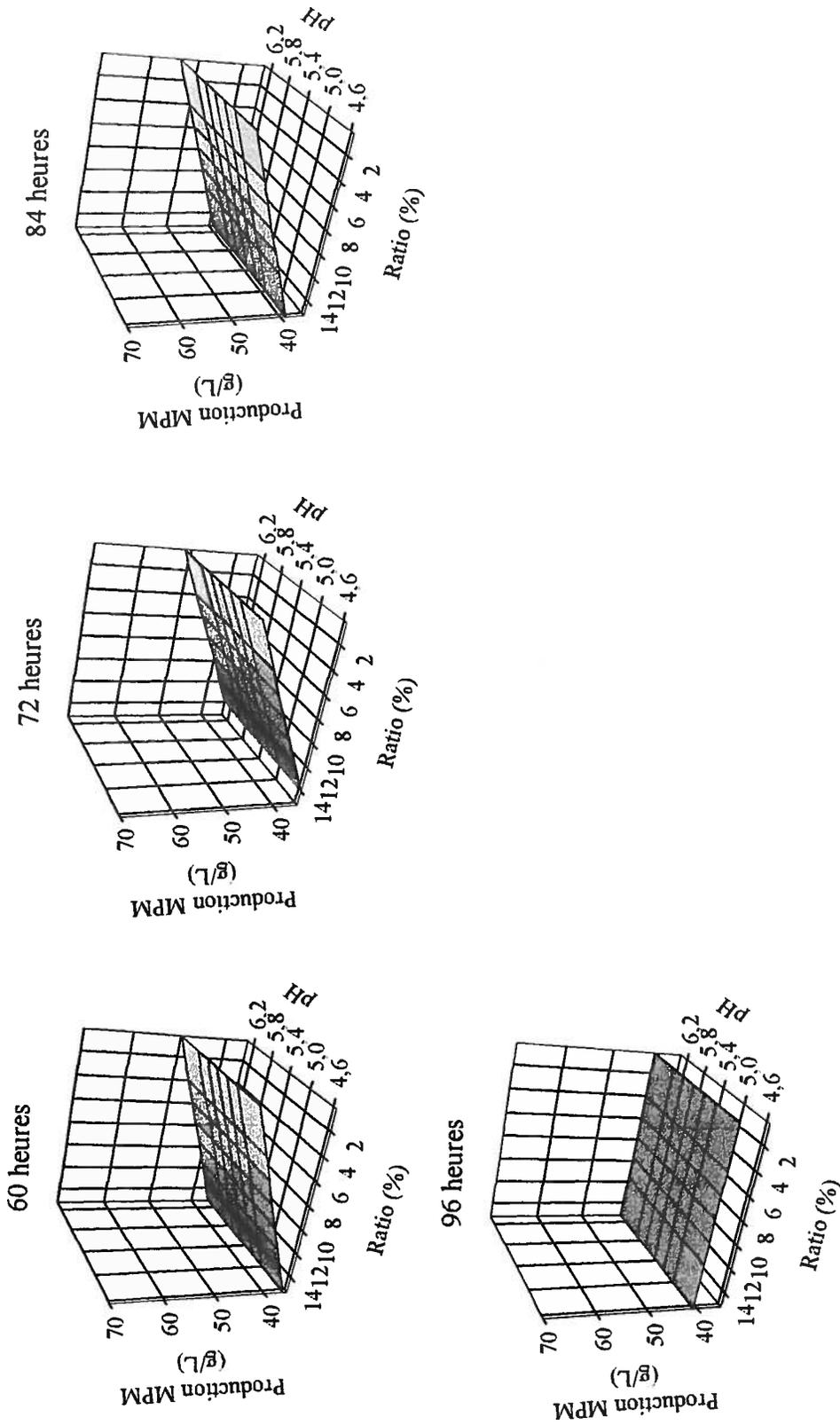
Annexe 5c : Influence combinée de la température (°C) et du ratio d'inoculation (%) sur la production de MPM^{msc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.



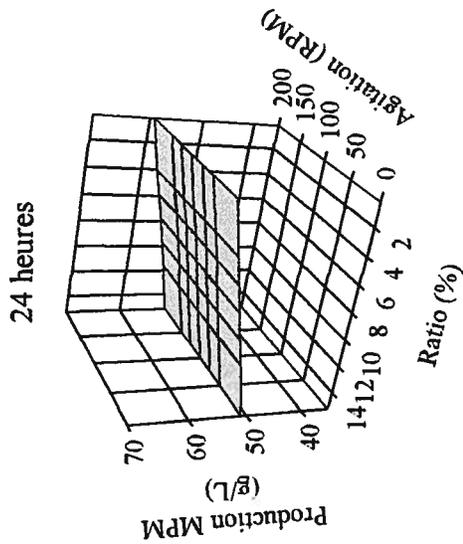
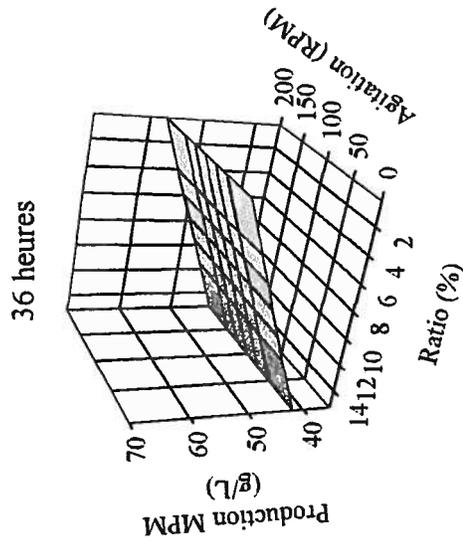
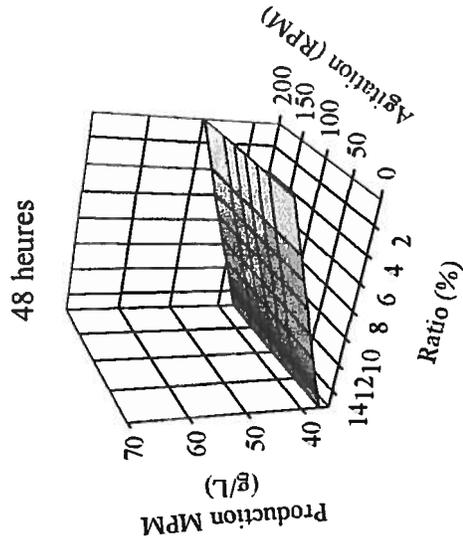
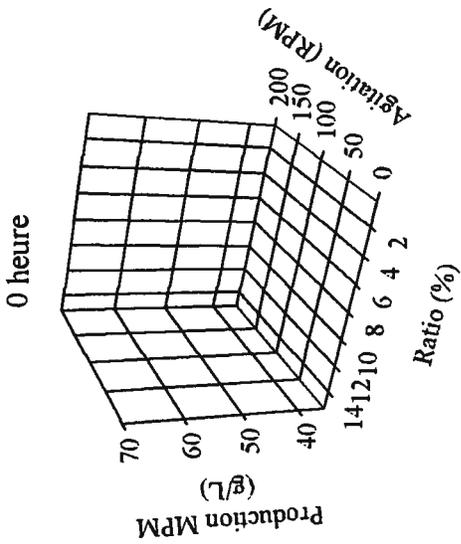
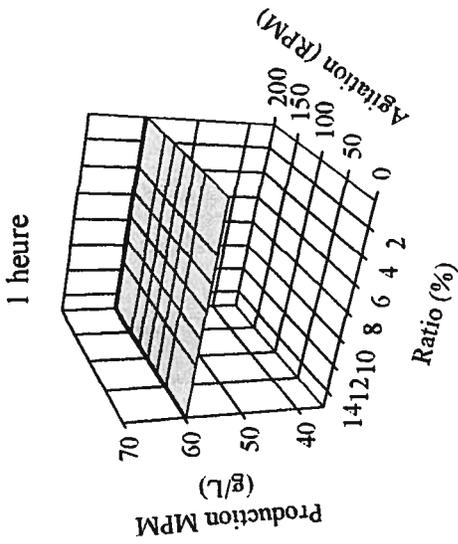
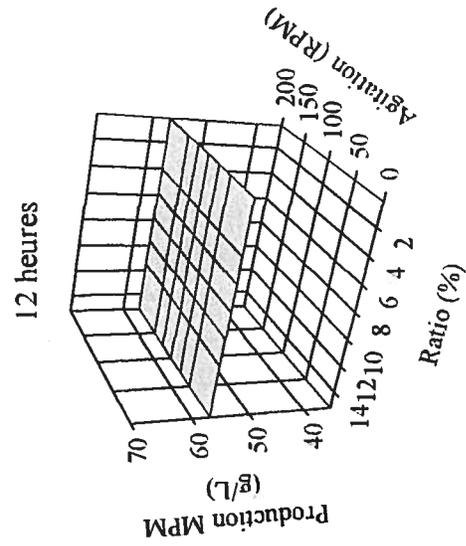


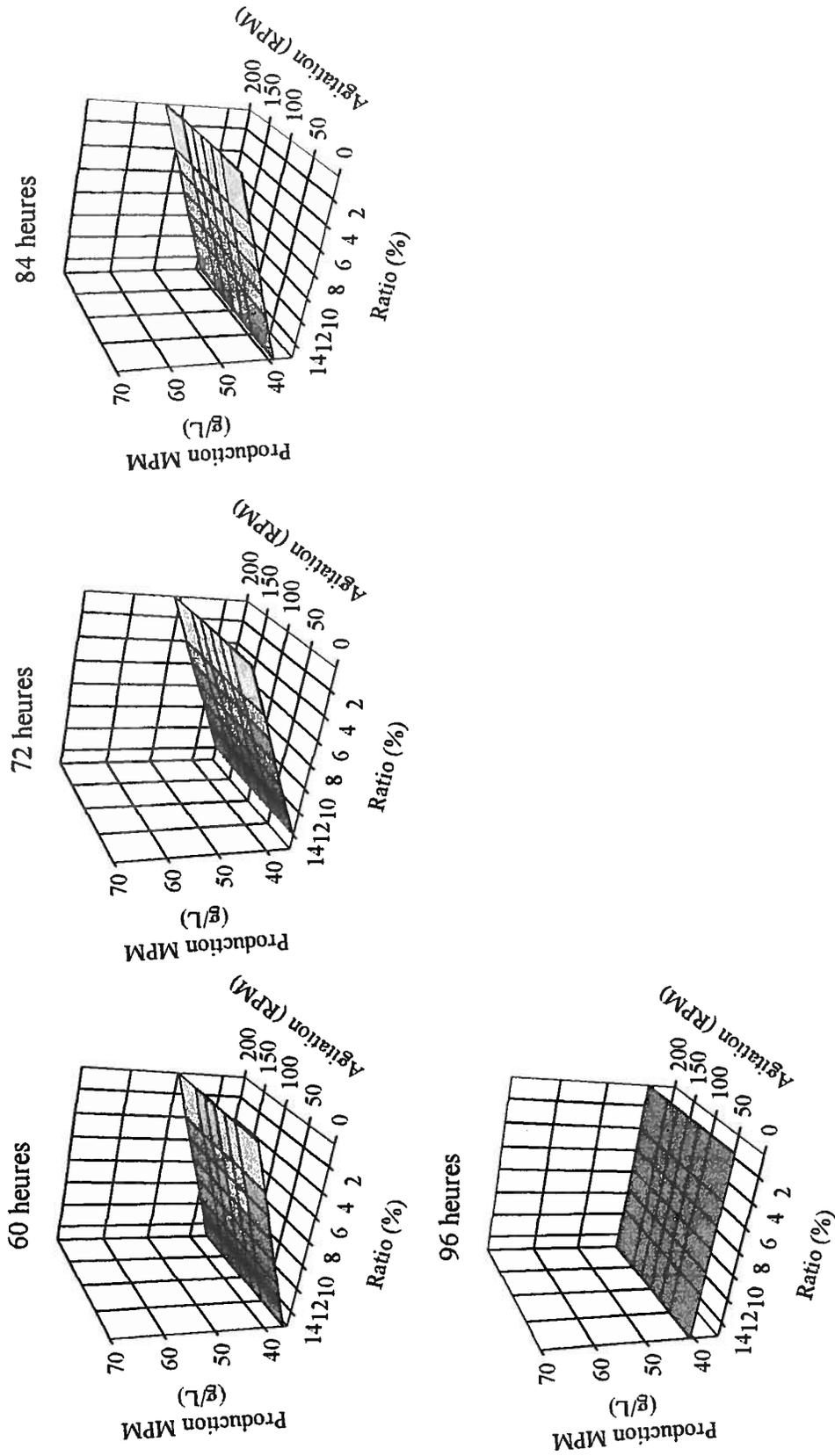
Annexe 5d : Influence combinée du pH et de l'agitation (rpm) sur la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.





Annexe 5e : Influence combinée du pH et du ratio d'inoculation (%) sur la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de p≤0,10.





Annexe Sf : Influence combinée de l'agitation (rpm) et du ratio d'inoculation (%) sur la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) avec un niveau de tolérance de $p \leq 0,10$.

ANNEXE 6

L'annexe 6 regroupe les tableaux de l'ensemble des données expérimentales, des données calculées à partir des modèles ainsi que la différence entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées.

Annexe 6a : Tableau des valeurs expérimentales du dénombrement bactérien (bactéries/ml) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	3,53E+06	3,53E+06	4,62E+06	8,71E+06	2,26E+07	3,70E+06	2,33E+08	2,77E+08	4,70E+08	4,22E+08
2	1,75E+05	3,37E+06	2,92E+07	8,19E+07	3,03E+08	4,59E+08	4,99E+08	4,96E+08	1,42E+08	1,83E+08
3	2,38E+04	2,38E+06	3,83E+06	4,71E+06	3,22E+06	5,78E+06	1,63E+07	4,41E+07	1,82E+07	1,57E+07
4	8,25E+03	3,49E+06	4,52E+06	4,43E+06	3,98E+06	2,24E+06	2,30E+06	8,46E+06	1,53E+07	9,05E+06
5	6,08E+04	4,52E+06	6,58E+04	7,98E+06	1,27E+07	1,22E+05	1,59E+07	1,45E+07	1,14E+06	2,21E+06
6	1,61E+05	7,21E+06	9,03E+06	7,51E+06	4,10E+06	1,38E+06	7,60E+05	1,35E+06	2,92E+07	3,24E+07
7	-1,88E+05	5,20E+06	3,50E+06	5,42E+06	1,09E+07	1,77E+07	1,99E+07	2,60E+07	1,63E+07	2,03E+07
8	4,38E+05	2,48E+06	1,25E+07	1,95E+07	1,42E+07	7,90E+06	1,28E+07	1,77E+07	4,51E+08	
9	0,00E+00	8,82E+06	1,43E+07	4,31E+07	2,20E+08	5,56E+08	4,67E+08	4,19E+08	2,93E+08	2,64E+08
10	1,04E+06	1,10E+07	7,93E+07	2,59E+07	2,32E+08	2,96E+08	3,22E+08	3,08E+08	3,76E+08	3,61E+08
11	7,50E+05	7,25E+06	1,42E+07	1,05E+08	1,57E+08	2,37E+08	3,34E+08	3,49E+08	5,49E+07	6,25E+07
12	3,05E+05	7,02E+06	1,38E+07	3,04E+07	5,06E+07	4,67E+07	5,70E+07	6,20E+07	2,64E+08	3,52E+08
13	2,84E+06	9,70E+06	1,70E+07	1,85E+07	4,96E+07	8,34E+07	1,41E+08	2,20E+08	4,86E+08	2,98E+08
14	0,00E+00	2,85E+06	1,51E+07	2,64E+07	1,80E+08	3,30E+08	4,68E+08	5,08E+08	2,81E+07	1,47E+07
15	0,00E+00	8,28E+06	2,51E+07	5,18E+07	5,57E+07	5,40E+07	5,46E+07	3,65E+07	1,04E+06	1,80E+06
16	1,02E+07	1,57E+07	2,49E+07	1,92E+07	6,93E+06	3,17E+06	5,50E+04	-1,58E+06	1,54E+07	9,29E+06
17	1,27E+06	4,70E+06	7,88E+06	1,12E+07	1,62E+07	1,39E+07	2,04E+07	1,94E+07	4,00E+05	9,25E+05
18	2,00E+06	4,33E+06	6,50E+05	8,00E+05	1,30E+06	1,33E+06	1,95E+06	9,00E+05	1,65E+08	2,35E+08
19	3,50E+04	8,75E+06	9,23E+06	1,19E+07	1,35E+07	1,41E+07	3,14E+07	9,45E+07	7,87E+06	6,72E+06
20	7,50E+04	8,51E+06	6,40E+06	1,02E+07	7,68E+06	8,57E+06	9,60E+06	8,80E+06	1,05E+08	1,16E+08
21	6,25E+04	4,22E+06	1,13E+07	5,65E+07	1,37E+08	1,44E+08	1,38E+08	1,34E+08	2,76E+08	2,84E+08
22	1,52E+06	4,10E+06	1,06E+07	2,53E+07	1,31E+08	2,53E+08	2,92E+08	2,86E+08	7,53E+06	6,12E+06
23	1,89E+06	9,30E+05	2,81E+06	4,07E+06	2,50E+06	4,25E+06	2,71E+06	7,28E+06	1,62E+08	2,03E+08
24	1,46E+06	1,48E+07	2,93E+07	7,31E+07	3,41E+08	2,23E+08	2,46E+08	2,18E+08	2,75E+08	2,75E+08
25	1,08E+05	2,70E+06	1,18E+07	2,38E+07	1,86E+08	1,90E+08	2,41E+08	2,32E+08	2,81E+08	2,88E+08
26	5,15E+04	8,98E+06	1,60E+07	2,52E+07	9,67E+07	2,10E+08	2,17E+08	2,93E+08	2,68E+08	2,73E+08
27	3,00E+04	8,43E+06	1,11E+07	5,49E+07	9,18E+07	2,04E+08	2,71E+08	2,93E+08	1,98E+08	2,25E+08
28	4,10E+05	1,33E+07	1,77E+07	1,99E+07	5,27E+07	9,52E+07	1,24E+08	2,10E+08		
29	0,00E+00	3,69E+06	2,79E+06	2,01E+06	1,64E+06	3,08E+05	0,00E+00	0,00E+00	-2,68E+05	9,50E+04

Annexe 6b : Tableau des valeurs calculées à partir des modèles pour le dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	0,00E+00	3,66E+06	9,07E+06	9,87E+06	5,08E+07	1,17E+08	1,59E+08	1,72E+08	1,80E+08	1,65E+08
2	0,00E+00	3,66E+06	1,95E+07	5,48E+07	1,21E+08	1,17E+08	1,59E+08	1,72E+08	1,80E+08	1,65E+08
3	0,00E+00	3,66E+06	4,52E+06	8,90E+06	6,03E+07	3,52E+06	1,81E+07	3,02E+07	2,92E+07	3,69E+07
4	0,00E+00	3,66E+06	-5,92E+06	1,47E+07	-1,03E+07	3,52E+06	1,81E+07	3,02E+07	2,92E+07	3,69E+07
5	0,00E+00	3,66E+06	-5,92E+06	-7,64E+06	-5,02E+06	1,17E+08	1,59E+08	1,72E+08	1,80E+08	1,65E+08
6	0,00E+00	3,66E+06	4,52E+06	3,72E+07	6,56E+07	1,17E+08	1,59E+08	1,72E+08	1,80E+08	1,65E+08
7	0,00E+00	3,66E+06	1,95E+07	-8,60E+06	4,53E+06	3,52E+06	1,81E+07	3,02E+07	2,92E+07	3,69E+07
8	0,00E+00	3,66E+06	9,07E+06	-2,85E+06	-6,61E+07	3,52E+06	1,81E+07	3,02E+07	2,92E+07	3,69E+07
9	0,00E+00	9,17E+06	2,45E+07	4,11E+07	1,55E+08	2,46E+08	2,87E+08	3,06E+08	2,96E+08	2,62E+08
10	0,00E+00	9,17E+06	3,50E+07	3,54E+07	2,26E+08	2,46E+08	2,87E+08	3,06E+08	2,96E+08	2,62E+08
11	0,00E+00	9,17E+06	2,00E+07	8,12E+07	1,65E+08	1,32E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
12	0,00E+00	9,17E+06	9,52E+06	3,64E+07	9,42E+07	1,32E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
13	0,00E+00	9,17E+06	9,52E+06	2,36E+07	9,95E+07	2,46E+08	2,87E+08	3,06E+08	2,96E+08	2,62E+08
14	0,00E+00	9,17E+06	2,00E+07	1,79E+07	1,70E+08	2,46E+08	2,87E+08	3,06E+08	2,96E+08	2,62E+08
15	0,00E+00	9,17E+06	3,50E+07	6,37E+07	1,09E+08	1,32E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
16	0,00E+00	9,17E+06	2,45E+07	1,88E+07	3,84E+07	1,32E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
17	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	1,05E+07	1,47E+07	1,25E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
18	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	1,05E+07	1,47E+07	1,25E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
19	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	1,05E+07	1,47E+07	1,25E+08	1,46E+08	1,64E+08	1,45E+08	1,33E+08
20	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	1,55E+07	7,76E+07	2,39E+08	2,94E+08	3,10E+08	3,13E+08	3,22E+08
21	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	1,55E+07	-4,45E+07	1,10E+07	1,12E+07	2,58E+07	1,18E+07	6,58E+07
22	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	5,76E+07	2,00E+08	1,25E+08	1,52E+08	1,68E+08	1,63E+08	1,94E+08
23	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	2,26E+07	8,84E+07	1,25E+08	1,52E+08	1,68E+08	1,63E+08	1,94E+08
24	0,00E+00	9,01E+05	-9,24E+05	1,36E+07	3,97E+07	-3,99E+06	2,49E+07	3,45E+07	4,66E+07	9,74E+07
25	0,00E+00	1,19E+07	3,00E+07	6,66E+07	2,49E+08	2,54E+08	2,80E+08	3,02E+08	2,78E+08	2,91E+08
26	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	4,01E+07	1,44E+08	1,25E+08	1,52E+08	1,68E+08	1,63E+08	1,94E+08
27	0,00E+00	6,42E+06	1,45E+07	4,01E+07	1,44E+08	1,25E+08	1,52E+08	1,68E+08	1,63E+08	1,94E+08
28	0,00E+00	1,19E+07	2,02E+07	1,26E+08	2,45E+08	1,97E+08	2,09E+08	2,31E+08	2,03E+08	1,82E+08
29	0,00E+00	6,42E+06	1,91E+07	-2,02E+07	-1,75E+08	1,10E+07	1,12E+07	2,58E+07	1,18E+07	2,11E+07

Annexe 6c : Tableau des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour le dénombrement bactérien (bactéries/mL) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	3,53E+06	-1,33E+05	-4,45E+06	-1,16E+06	-2,82E+07	-1,14E+08	7,34E+07	1,04E+08	-1,80E+08	-1,65E+08
2	1,75E+05	-2,86E+05	9,66E+06	2,72E+07	1,82E+08	3,42E+08	3,40E+08	3,23E+08	2,90E+08	2,57E+08
3	2,38E+04	-1,28E+06	-6,87E+05	-4,19E+06	-5,71E+07	2,26E+06	-1,73E+06	1,39E+07	1,12E+08	1,47E+08
4	8,25E+03	-1,68E+05	1,04E+07	-1,02E+07	1,42E+07	-1,28E+06	-1,58E+07	-2,17E+07	-1,10E+07	-2,11E+07
5	6,08E+04	8,66E+05	5,99E+06	1,56E+07	1,77E+07	-1,17E+08	-1,43E+08	-1,58E+08	-1,65E+08	-1,56E+08
6	1,61E+05	3,55E+06	4,50E+06	-2,97E+07	-6,15E+07	-1,16E+08	-1,58E+08	-1,71E+08	-1,79E+08	-1,63E+08
7	-1,88E+05	1,54E+06	-1,60E+07	1,40E+07	6,37E+06	1,42E+07	1,84E+06	-4,14E+06	-5,07E+04	-4,50E+06
8	4,38E+05	-1,18E+06	3,39E+06	2,23E+07	8,03E+07	4,38E+06	-5,30E+06	-1,25E+07	-1,29E+07	-1,65E+07
9	0,00E+00	-3,57E+05	-1,02E+07	1,94E+06	6,45E+07	3,10E+08	1,81E+08	1,13E+08	1,55E+08	-2,62E+08
10	1,04E+06	1,86E+06	4,44E+07	-9,45E+06	5,91E+06	4,99E+07	3,56E+07	2,48E+06	-3,09E+06	2,53E+06
11	7,50E+05	-1,92E+06	-5,76E+06	2,34E+07	-8,03E+06	1,05E+08	1,88E+08	1,85E+08	2,31E+08	2,28E+08
12	3,05E+05	-2,16E+06	4,23E+06	-5,96E+06	-4,36E+07	-8,57E+07	-8,86E+07	-1,02E+08	-9,02E+07	-7,10E+07
13	2,84E+06	5,26E+05	7,52E+06	-5,15E+06	-4,99E+07	-1,63E+08	-1,46E+08	-8,55E+07	-3,19E+07	9,01E+07
14	0,00E+00	-6,32E+06	-4,91E+06	8,50E+06	9,63E+06	8,39E+07	1,81E+08	2,02E+08	1,90E+08	3,64E+07
15	0,00E+00	-8,94E+05	-9,82E+06	-1,20E+07	-5,33E+07	-7,83E+07	-9,09E+07	-1,27E+08	-1,17E+08	-1,19E+08
16	1,02E+07	6,48E+06	3,50E+05	3,86E+05	-3,15E+07	-1,29E+08	-1,46E+08	-1,65E+08	-1,44E+08	-1,32E+08
17	1,27E+06	-1,72E+06	-6,63E+06	7,78E+05	1,53E+06	-1,11E+08	-1,32E+08	-1,49E+08	-1,47E+08	-5,63E+06
18	2,00E+06	-2,09E+06	-1,39E+07	-9,65E+06	-1,34E+07	-1,23E+08	-1,50E+08	-1,67E+08	-1,62E+08	-1,40E+07
19	3,50E+04	2,34E+06	-5,28E+06	-3,58E+06	-6,41E+07	-2,25E+08	-2,62E+08	-2,16E+08	-1,48E+08	-8,73E+07
20	7,50E+04	2,09E+06	-8,12E+06	-5,30E+06	5,22E+07	-2,46E+06	-1,65E+06	-1,70E+07	-3,91E+06	-5,91E+07
21	6,25E+04	-2,19E+06	-3,21E+06	-1,06E+06	-6,32E+07	1,91E+07	-1,48E+07	-3,39E+07	-5,77E+07	-7,76E+07
22	1,52E+06	-2,32E+06	-3,87E+06	2,71E+06	4,26E+07	1,28E+08	1,40E+08	1,18E+08	1,14E+08	8,98E+07
23	1,89E+06	2,86E+04	3,74E+06	-9,55E+06	-3,72E+07	8,24E+06	-2,22E+07	-2,72E+07	-3,91E+07	-9,13E+07
24	1,46E+06	2,88E+06	-6,65E+05	6,50E+06	9,27E+07	-3,08E+07	-3,39E+07	-8,39E+07	-1,17E+08	-8,77E+07
25	1,08E+05	-3,71E+06	-2,71E+06	-1,63E+07	4,14E+07	6,51E+07	8,84E+07	6,39E+07	1,12E+08	8,15E+07
26	5,15E+04	2,56E+06	1,45E+06	-1,48E+07	-4,75E+07	8,55E+07	6,49E+07	1,25E+08	1,18E+08	9,36E+07
27	3,00E+04	2,01E+06	-3,45E+06	1,48E+07	-5,24E+07	7,97E+07	1,19E+08	1,25E+08	1,05E+08	7,93E+07
28	4,10E+05	1,33E+06	-2,50E+06	-1,06E+08	-1,92E+08	-1,01E+08	-8,50E+07	-2,01E+07	-5,20E+06	4,29E+07
29	0,00E+00	-2,72E+06	-1,63E+07	2,22E+07	1,77E+08	-1,07E+07	-1,12E+07	-2,58E+07	-1,20E+07	-2,10E+07

Annexe 6d : Tableau des valeurs expérimentales pour la production d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	26,4	24,9	25,3	28,7	24,4	27,9	35,7	58,1	59,8	73,7
2	10,4	10,7	11,4	20,8	42,9	54,2	60,7	61,6	45,4	44,2
3	9,8	7,5	8,1	9,6	7,3	8,1	8,3	10,0	14,6	17,6
4	9,4	9,2	9,8	8,9	9,6	10,6	9,9	9,1	9,5	10,0
5	12,2	11,7	9,7	12,2	10,7	10,2	11,0	10,2	10,9	9,8
6	17,0	16,9	16,8	18,3	19,4	18,9	20,8	21,2	19,4	20,2
7	24,7	11,1	10,9	7,9	9,7	11,3	10,8	11,0	13,0	15,5
8	11,6	6,0	9,3	11,9	19,2	20,3	25,4	26,6	28,3	30,3
9	16,9	16,9	16,5	18,1	21,7	36,8	49,9	58,8	56,0	54,5
10	15,4	15,9	17,1	19,7	32,6	43,8	48,9	50,0	55,3	50,5
11	13,2	11,9	11,8	13,9	19,6	31,1	33,2	36,4	35,8	35,8
12	21,6	14,7	16,1	17,2	20,9	26,3	31,3	36,5	38,7	44,5
13	19,9	17,5	18,7	19,1	21,3	23,6	25,9	33,5	40,4	48,4
14	9,9	12,9	14,9	20,4	44,7	57,0	66,6	51,2	47,5	46,5
15	10,7	10,8	11,8	13,9	13,4	12,4	12,6	12,3	11,3	11,3
16	15,5	14,9	13,6	15,6	17,4	16,9	16,5	16,6	16,8	17,2
17	16,7	16,6	16,3	16,7	18,0	17,9	17,3	17,6	17,7	16,5
18	19,9	16,6	16,1	16,9	17,2	16,6	17,7	17,1	17,1	16,8
19	47,9	38,6	38,4	37,1	38,1	38,7	37,7	38,7	41,9	46,9
20	46,3	32,6	19,8	22,9	21,7	18,9	19,7	19,7	19,6	19,5
21	14,1	14,7	16,3	20,8	33,4	41,6	45,5	46,9	48,9	50,2
22	15,3	18,6	17,9	18,8	26,1	39,6	48,8	43,8	41,9	41,3
23	20,9	17,2	16,6	16,8	16,3	18,4	18,5	20,5	21,4	21,9
24	15,4	14,8	13,0	22,5	38,6	45,5	47,1	45,9	44,0	41,9
25	11,9	8,5	9,8	12,2	21,8	35,5	45,7	47,0	45,4	46,6
26	10,6	10,1	9,4	10,8	19,8	36,4	50,6	48,6	44,9	43,1
27	9,1	8,9	9,0	11,3	17,0	37,8	52,7	52,9	51,2	48,3
28	15,8	14,7	13,9	13,9	18,2	20,0	24,9	30,6	38,9	42,0
29	47,5	32,7	20,3	23,3	23,8	24,3	23,6	23,3	23,0	24,8

Annexe 6e : Tableau des valeurs calculées pour la production d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	18,3	18,0	18,5	21,1	20,8	21,4	33,5	46,6	41,5	43,6
2	18,3	18,0	18,5	21,1	27,2	36,4	33,5	46,6	32,9	43,6
3	18,3	13,6	12,2	13,9	9,7	14,8	16,2	17,1	23,9	25,3
4	18,3	13,6	12,2	13,9	16,1	13,8	16,2	17,1	15,3	25,3
5	18,3	18,0	18,5	21,1	20,8	21,4	33,5	23,7	21,1	31,2
6	18,3	18,0	18,5	21,1	27,2	36,4	33,5	23,7	29,7	31,2
7	18,3	13,6	12,2	13,9	9,7	14,8	16,2	15,9	3,5	12,8
8	18,3	13,6	12,2	13,9	16,1	13,8	16,2	15,9	12,1	12,8
9	18,3	18,0	18,5	21,1	28,6	33,1	46,8	58,2	53,7	54,3
10	18,3	18,0	18,5	21,1	35,0	48,2	46,8	58,2	45,1	54,3
11	18,3	13,6	12,2	13,9	17,4	26,6	29,5	28,6	36,1	35,9
12	18,3	13,6	12,2	13,9	23,9	25,5	29,5	28,6	27,4	35,9
13	18,3	18,0	18,5	21,1	28,6	33,1	46,8	35,3	33,3	41,8
14	18,3	18,0	18,5	21,1	35,0	48,2	46,8	35,3	41,9	41,8
15	18,3	13,6	12,2	13,9	17,4	26,6	29,5	27,5	15,6	23,4
16	18,3	13,6	12,2	13,9	23,9	25,5	29,5	27,5	24,3	23,4
17	10,8	10,8	11,8	14,3	15,9	6,4	13,0	17,0	15,1	15,8
18	10,8	10,8	11,8	14,3	28,7	20,4	13,0	17,0	15,1	15,8
19	41,0	35,2	32,4	34,3	33,4	46,8	55,0	47,5	40,1	57,8
20	41,0	26,3	19,7	19,8	11,2	17,6	20,4	10,2	4,8	21,0
21	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	59,7	50,2	51,9
22	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	35,7	26,6	26,9
23	10,8	10,8	11,8	14,3	14,6	20,5	24,4	21,3	26,2	28,8
24	10,8	10,8	11,8	14,3	30,1	43,9	50,9	44,4	50,6	50,0
25	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	47,7	38,4	39,4
26	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	47,7	38,4	39,4
27	10,8	10,8	11,8	14,3	22,3	32,2	37,7	47,7	38,4	39,4
28	18,3	13,6	12,2	13,9	21,3	32,4	36,1	23,8	52,4	47,4
29	41,0	26,3	19,7	19,8	14,4	8,4	14,2	7,4	-2,6	8,9

Annexe 6f : Tableau des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour la production d'acide lactique (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	8,0	6,9	6,8	7,6	3,6	6,5	2,2	11,5	18,3	30,1
2	-8,0	-7,2	-7,2	-0,3	15,7	17,7	27,2	15,0	12,5	0,6
3	-8,5	-6,0	-4,1	-4,3	-2,4	-6,8	-7,9	-7,1	-9,3	-7,7
4	-8,9	-4,4	-2,4	-5,0	-6,5	-3,3	-6,4	-8,0	-5,8	-15,3
5	-6,2	-6,3	-8,8	-8,9	-10,1	-11,2	-22,5	-13,6	-10,1	-21,4
6	-1,3	-1,1	-1,7	-2,8	-7,8	-17,5	-12,7	-2,6	-10,3	-11,0
7	6,4	-2,4	-1,3	-5,9	0,0	-3,6	-5,4	-4,9	9,5	2,7
8	-6,7	-7,6	-2,9	-2,0	3,1	6,5	9,2	10,7	16,2	17,5
9	-1,4	-1,1	-2,0	-3,0	-6,8	3,7	3,1	0,7	2,3	0,3
10	-2,9	-2,1	-1,4	-1,5	-2,4	-4,3	2,1	-8,2	10,3	-3,7
11	-5,1	-1,7	-0,4	0,0	2,2	4,5	3,7	7,8	-0,3	-0,1
12	3,3	1,2	3,9	3,3	-2,9	0,7	1,8	7,9	11,2	8,6
13	1,6	-0,5	0,2	-2,0	-7,2	-9,5	-20,9	-1,8	7,1	6,6
14	-8,4	-5,1	-3,7	-0,7	9,8	8,8	19,8	16,0	5,6	4,7
15	-7,7	-2,7	-0,3	0,1	-4,0	-14,1	-16,8	-15,1	-4,3	-12,1
16	-2,8	1,4	1,4	1,7	-6,4	-8,6	-13,0	-10,9	-7,5	-6,2
17	5,9	5,8	4,5	2,4	2,1	11,4	4,3	0,6	2,6	0,7
18	9,1	5,9	4,3	2,6	-11,5	-3,8	4,8	0,1	2,0	0,9
19	6,9	3,4	6,0	2,8	4,7	-8,1	-17,2	-8,8	1,8	-10,9
20	5,3	6,3	0,1	3,1	10,5	1,4	-0,7	9,5	14,7	-1,6
21	3,3	3,9	4,5	6,5	11,0	9,4	7,8	-12,8	-1,2	-1,6
22	4,5	7,8	6,1	4,5	3,8	7,4	11,1	8,1	15,3	14,3
23	10,1	6,4	4,8	2,4	1,8	-2,0	-5,9	-0,8	-4,8	-6,9
24	4,6	4,0	1,2	8,1	8,6	1,6	-3,9	1,5	-6,5	-8,2
25	1,1	-2,3	-2,0	-2,1	-0,5	3,3	8,0	-0,7	7,0	7,2
26	-0,2	-0,6	-2,4	-3,5	-2,6	4,3	12,9	0,9	6,6	3,7
27	-1,7	-1,9	-2,8	-3,0	-5,4	5,6	15,0	5,2	12,8	8,9
28	-2,6	1,2	1,7	0,0	-3,1	-12,4	-11,3	6,8	-13,5	-5,4
29	6,5	6,4	0,6	3,5	9,4	16,0	9,4	16,0	25,5	15,9

Annexe 6g : Tableau des valeurs expérimentales pour l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	0,0	138,4	131,8	121,5	114,9	121,7	104,1	96,4	90,9	64,8
2	148,5	144,2	138,5	104,0	71,4	24,5	3,9	0,4	0,4	0,8
3	139,0	140,6	139,2	149,3	123,6	136,8	131,9	111,7	97,9	76,0
4	131,9	131,6	123,6	125,9	141,2	124,7	109,3	108,7	108,1	109,7
5	179,2	179,6	181,8	182,9	182,5	179,1	143,4	144,3	152,9	147,6
6	192,1	188,4	191,7	186,8	181,9	183,0	146,4	145,2	127,2	122,3
7	128,0	126,3	126,2	127,7	131,4	122,4	113,9	115,3	102,4	105,2
8	137,5	143,9	137,3	135,9	127,6	116,4	96,9	87,1	78,5	67,0
9	118,2	118,7	120,9	118,7	105,4	70,5	28,0	4,9	0,8	0,8
10	123,8	125,3	121,0	93,9	68,4	37,9	12,3	3,0	0,0	0,0
11	148,5	144,5	141,9	130,5	98,0	67,4	21,7	21,7	10,5	7,4
12	131,6	133,4	129,7	119,4	109,2	94,6	74,8	62,3	45,5	34,1
13	142,2	142,3	143,7	138,8	130,5	124,6	101,4	94,9	76,4	60,4
14	143,6	143,4	140,7	112,5	70,1	30,1	3,9	0,5	0,5	0,6
15	155,6	152,6	145,8	148,8	151,1	148,8	130,3	129,8	129,7	136,4
16	122,3	125,1	122,0	119,5	111,4	100,9	88,7	83,9	78,6	73,8
17	133,5	117,9	132,3	123,3	135,1	135,3	112,0	123,5	122,7	125,3
18	143,6	151,1	142,1	143,8	141,5	142,7	128,6	126,8	126,1	124,4
19	127,6	123,3	123,6	104,1	123,4	120,7	107,7	104,6	95,4	77,8
20	118,9	103,0	120,3	110,6	119,2	116,8	110,4	109,4	108,8	108,3
21	145,3	144,3	128,1	127,3	93,7	71,5	43,9	31,3	19,3	12,8
22	135,5	138,2	130,9	124,1	111,7	65,2	7,4	0,0	0,0	0,0
23	143,3	147,3	142,5	146,2	113,7	137,4	133,8	130,6	129,5	127,0
24	137,5	138,1	138,6	116,0	51,5	34,9	8,4	0,6	0,6	0,0
25	187,7	206,6	212,7	198,5	155,9	99,1	37,3	13,8	3,9	1,7
26	184,1	175,9	181,5	175,3	136,1	99,9	47,6	14,7	6,2	2,7
27	184,2	180,3	183,8	178,1	150,9	106,5	51,3	18,1	6,6	2,9
28	124,9	102,5	127,0	124,1	117,0	100,6	82,8	62,1	46,0	28,2
29	124,0	124,4	94,1	127,9	95,1	120,6	113,0	108,7	109,3	104,8

Annexe 6h : Tableau des valeurs calculées à partir des modèles pour l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	144,4	143,4	130,0	132,4	120,7	113,5	108,2	88,7	84,3	76,0
2	144,4	143,4	130,0	132,4	120,7	113,5	108,2	88,7	84,3	76,0
3	143,8	143,4	132,2	154,4	120,7	113,5	108,2	88,7	84,3	76,0
4	143,8	143,4	132,2	154,4	120,7	113,5	108,2	88,7	84,3	76,0
5	162,1	143,4	160,9	154,4	144,9	139,8	108,2	116,2	113,8	108,9
6	162,1	143,4	160,9	154,4	144,9	139,8	108,2	116,2	113,8	108,9
7	126,1	143,4	126,0	132,4	144,9	139,8	108,2	116,2	113,8	108,9
8	126,1	143,4	126,0	132,4	144,9	139,8	108,2	116,2	113,8	108,9
9	126,1	143,4	113,6	114,7	91,1	68,6	54,9	33,0	28,2	23,2
10	126,1	143,4	113,6	114,7	91,1	68,6	54,9	33,0	28,2	23,2
11	162,1	143,4	148,5	136,6	91,1	68,6	54,9	33,0	28,2	23,2
12	162,1	143,4	148,5	136,6	91,1	68,6	54,9	33,0	28,2	23,2
13	143,8	143,4	144,6	136,6	115,3	94,9	54,9	60,5	57,6	56,1
14	143,8	143,4	144,6	136,6	115,3	94,9	54,9	60,5	57,6	56,1
15	144,4	143,4	142,3	114,7	115,3	94,9	54,9	60,5	57,6	56,1
16	144,4	143,4	142,3	114,7	115,3	94,9	54,9	60,5	57,6	56,1
17	152,4	154,2	142,1	145,0	139,6	104,2	121,2	127,2	120,0	118,6
18	152,4	154,2	142,1	145,0	139,6	104,2	121,2	127,2	120,0	118,6
19	119,3	111,1	127,0	102,9	139,6	104,2	109,9	109,1	97,7	86,8
20	119,3	111,1	127,0	102,9	139,6	104,2	109,9	109,1	97,7	86,8
21	152,4	154,2	122,1	145,0	82,3	78,0	47,6	3,6	-24,0	-31,4
22	152,4	154,2	146,8	145,0	130,7	130,4	47,6	58,5	34,9	34,4
23	152,4	154,2	145,5	162,7	116,0	149,1	100,9	86,7	116,8	110,1
24	152,4	154,2	145,5	127,3	56,8	59,3	-5,7	-24,6	4,5	4,4
25	152,4	154,2	192,7	145,0	139,6	104,2	47,6	31,1	5,4	1,5
26	152,4	154,2	192,7	145,0	139,6	104,2	47,6	31,1	5,4	1,5
27	152,4	154,2	192,7	145,0	139,6	104,2	47,6	31,1	5,4	1,5
28	180,1	143,4	80,8	138,8	-0,5	33,1	28,2	-8,5	26,8	22,2
29	101,6	111,1	87,3	80,9	143,4	117,3	128,3	146,8	141,1	132,5

Annexe 6i : Tableau des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour l'utilisation du lactose (mM) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	0,0	-5,0	1,8	-10,9	-5,8	8,1	-4,1	7,7	6,5	-11,2
2	4,1	0,8	8,6	-28,4	-49,3	-89,0	-104,3	-88,3	-83,9	-75,3
3	-4,8	-2,8	7,0	-5,0	2,9	23,3	23,7	23,0	13,6	-0,1
4	-12,0	-11,8	-8,7	-28,4	20,5	11,2	1,2	20,0	23,8	33,6
5	17,1	36,2	20,9	28,5	37,6	39,3	35,3	28,2	39,1	38,8
6	30,0	45,0	30,9	32,4	37,0	43,3	38,3	29,1	13,5	13,4
7	1,9	-17,1	0,2	-4,6	-13,5	-17,4	5,7	-0,8	-11,3	-3,7
8	11,4	0,5	11,3	3,6	-17,3	-23,4	-11,3	-29,1	-35,3	-41,8
9	-7,9	-24,7	7,3	4,1	14,3	1,8	-26,9	-28,1	-27,3	-22,4
10	-2,3	-18,1	7,4	-20,7	-22,7	-30,8	-42,6	-30,0	-28,2	-23,2
11	-13,6	1,1	-6,6	-6,2	6,8	-1,2	-33,2	-11,3	-17,7	-15,8
12	-30,5	-10,0	-18,8	-17,2	18,1	25,9	19,9	29,3	17,4	10,9
13	-1,6	-1,1	-0,8	2,1	15,1	29,8	46,5	34,5	18,8	4,3
14	-0,3	0,0	-3,9	-24,2	-45,3	-64,7	-51,0	-60,0	-57,1	-55,5
15	11,2	9,2	3,5	34,1	35,8	54,0	75,5	69,3	72,1	80,4
16	-22,1	-18,3	-20,3	4,9	-3,9	6,0	33,9	23,4	21,0	17,7
17	-18,9	-36,3	-9,9	-21,8	-4,5	31,1	-9,1	-3,7	2,7	6,7
18	-8,8	-3,1	-0,1	-1,3	1,9	38,5	7,5	-0,4	6,1	5,8
19	8,3	12,2	-3,3	1,2	-16,2	16,5	-2,2	-4,5	-2,3	-9,0
20	-0,4	-8,2	-6,6	7,8	-20,5	12,6	0,6	0,3	11,1	21,4
21	-7,1	-9,8	6,0	-17,8	11,4	-6,4	-3,7	27,7	43,4	44,1
22	-16,8	-16,0	-15,9	-21,0	-19,0	-65,2	-40,1	-58,5	-34,9	-34,4
23	-9,0	-6,8	-3,0	-16,5	-2,3	-11,7	32,9	43,9	12,7	16,9
24	-14,8	-16,0	-7,0	-11,4	-5,3	-24,4	14,1	25,2	-3,9	-4,4
25	35,4	52,4	20,0	53,4	16,3	-5,1	-10,3	-17,2	-1,5	0,2
26	31,8	21,7	-11,2	30,2	-3,5	-4,3	0,0	-16,3	0,7	1,2
27	31,9	26,2	-8,9	33,1	11,3	2,3	3,8	-12,9	1,2	1,4
28	-55,2	-40,9	46,2	-14,7	117,5	67,5	54,5	70,6	19,2	6,0
29	22,4	13,3	6,7	47,1	-48,4	3,3	-15,2	-38,1	-31,7	-27,7

Annexe 6j : Tableau des valeurs expérimentales pour la production de MPM^{mic} (g/L) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1R	0,0	0,0	56,0	56,9	55,7	58,0	60,2	44,5	44,8	40,8
2R	66,3	60,6	50,7	46,9	31,4	33,9	39,0	37,3	46,2	44,1
3	59,9	53,5	58,2	59,6	60,1	50,6	57,8	56,4	58,5	49,7
4	61,5	31,4	58,5	61,2	57,5	53,9	57,9	59,3	59,4	55,3
5	63,5	65,9	69,2	63,3	67,8	58,3	69,6	58,3	61,6	50,4
6a	63,9	62,8	64,8	62,7	60,4	55,7	62,1	64,0	52,6	59,3
7	59,5	55,0	45,6	49,4	48,8	51,8	48,0	49,7	57,3	47,2
8r	55,2	55,0	47,7	49,0	44,9	47,4	42,1	45,0	41,3	43,1
9r	0,0	55,8	53,3	53,6	48,3	37,8	34,6	32,7	41,1	
10	53,2	58,5	54,1	49,3	36,7	43,7	46,8	40,4	39,9	40,8
11	65,4	64,7	65,3	58,8	56,1	46,5	38,9	42,1		
12	55,2	58,0	53,2	51,7	46,6	46,1	41,3	42,2	37,7	
13	55,6	54,8	51,8	51,2	50,6	46,5	47,6	39,1	35,0	
14	65,9	61,7	49,6	45,1	35,2	33,7	39,0	36,1	42,7	47,7
15	65,3	61,0	50,2	49,3	50,6	50,5	63,0	59,6	68,8	74,0
16	59,5	60,9	52,4	53,0	51,3	57,8	53,5	53,4	53,1	50,1
17	55,8	56,3	54,4	52,4	54,9	56,7	54,2	47,4	52,1	52,7
18	53,8	47,5	50,4	52,3	52,3	49,8	55,5	50,3	48,5	
19	51,2	46,3	48,1	43,9	44,5	45,6	46,5	43,8	44,6	37,0
20	50,4	45,9	40,4	40,2	37,6	38,3	41,9	39,4	43,1	44,9
21	56,3	56,9	51,1	49,6	40,8	40,5	36,3	34,0	37,0	39,6
22	53,3	58,4	48,7	47,1	43,4	36,5	31,7	33,0	32,7	30,8
23	54,2	53,7	50,6	52,1	52,4	50,4	37,0	50,5	48,0	
24	51,6	53,8	49,5	46,3	32,8	34,1	31,1	31,5	33,7	31,2
25	69,6	68,0	66,4	60,8	54,8	39,1	39,8	42,7	50,3	42,5
26	62,9	65,4	64,2	60,1	60,4	42,8	44,7	37,7	39,8	34,0
27	60,2	66,0	66,5	58,7	61,2	42,8	43,2	42,0	41,8	37,3
28	56,8	61,9	54,0	52,3	51,4	51,2	46,2	43,0	41,3	33,4
29	48,6	46,7	46,6	46,9	46,6	46,3	44,8	42,1	42,4	40,3

Annexe 6k : Tableau des valeurs calculées à partir des modèles pour la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	0,0	61,0	53,1	51,6	52,4	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
2	0,0	61,0	53,1	51,6	45,8	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
3	0,0	52,3	55,3	57,4	60,7	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
4	0,0	52,3	55,3	57,4	54,1	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
5	0,0	61,0	60,6	57,4	60,7	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
6	0,0	61,0	60,6	57,4	54,1	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
7	0,0	52,3	47,7	51,6	52,4	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
8	0,0	52,3	47,7	51,6	45,8	49,9	50,8	49,7	50,2	46,3
9	0,0	52,3	47,7	47,6	44,9	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
10	0,0	52,3	47,7	47,6	38,3	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
11	0,0	61,0	60,6	53,3	53,2	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
12	0,0	61,0	60,6	53,3	46,6	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
13	0,0	52,3	55,3	53,3	53,2	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
14	0,0	52,3	55,3	53,3	46,6	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
15	0,0	61,0	53,1	47,6	44,9	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
16	0,0	61,0	53,1	47,6	38,3	43,3	43,8	40,8	42,7	46,3
17	0,0	59,6	56,9	55,0	56,1	56,5	60,4	53,5	46,5	62,6
18	0,0	59,6	56,9	55,0	42,9	56,5	60,4	53,5	46,5	62,6
19	0,0	47,9	46,0	44,8	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
20	0,0	47,9	46,0	44,8	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
21	0,0	59,6	56,9	55,0	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
22	0,0	59,6	56,9	55,0	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
23	0,0	59,6	56,9	59,1	57,0	49,9	49,9	51,4	53,9	40,9
24	0,0	59,6	56,9	51,0	42,0	36,7	35,9	33,6	39,0	40,9
25	0,0	59,6	56,9	55,0	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
26	0,0	59,6	56,9	55,0	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
27	0,0	59,6	56,9	55,0	49,5	43,3	42,9	42,5	46,5	40,9
28	0,0	65,3	67,1	54,2	53,6	40,0	40,3	36,3	39,0	46,3
29	0,0	47,9	38,4	39,0	37,9	46,6	47,3	45,2	46,5	46,3

Annexe 61 : Tableau des différences entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées pour la production de MPM^{mc} (g/L) en fonction du temps (heure) pour les fermentations 1 à 29.

Fermentation	0	1	12	24	36	48	60	72	84	96
1	0,0	-61,0	2,9	5,3	3,3	8,1	9,5	-5,2	-5,4	-5,5
2	66,3	-0,3	-2,3	-4,7	-14,5	-16,0	-11,8	-12,4	-4,0	-2,2
3	59,9	1,2	3,0	2,2	-0,7	0,7	7,0	6,7	8,3	3,4
4	61,5	-20,9	3,2	3,9	3,4	3,9	7,2	9,7	9,2	9,0
5	63,5	4,9	8,6	5,9	7,1	8,3	18,8	8,7	11,4	4,1
6	63,9	1,8	4,1	5,3	6,3	5,8	11,3	14,4	2,4	13,0
7	59,5	2,7	-2,1	-2,2	-3,6	1,8	-2,8	0,0	7,2	0,9
8	55,2	2,7	0,0	-2,6	-0,9	-2,5	-8,6	-4,7	-8,8	-3,2
9	0,0	3,5	5,5	6,1	3,4	-5,5	-9,2	-8,1	-1,6	-46,3
10	53,2	6,1	6,4	1,8	-1,6	0,3	3,0	-0,4	-2,9	-5,5
11	65,4	3,7	4,7	5,5	2,9	3,2	-4,9	1,3	-42,7	-46,3
12	55,2	-3,0	-7,4	-1,7	-0,1	2,8	-2,5	1,4	-5,0	-46,3
13	55,6	2,4	-3,5	-2,1	-2,6	3,2	3,8	-1,6	-7,7	-46,3
14	65,9	9,4	-5,6	-8,2	-11,4	-9,6	-4,8	-4,6	-0,1	1,4
15	65,3	0,0	-2,9	1,7	5,7	7,2	19,2	18,8	26,1	27,7
16	59,5	-0,1	-0,7	5,4	13,0	14,5	9,7	12,6	10,4	3,8
17	55,8	-3,3	-2,5	-2,7	-1,2	0,2	-6,3	-6,0	5,6	-9,9
18	53,8	-12,1	-6,5	-2,8	9,4	-6,8	-5,0	-3,1	2,0	-62,6
19	51,2	-1,5	2,1	-0,9	-5,1	2,3	3,6	1,3	-1,8	-3,9
20	50,4	-2,0	-5,6	-4,5	-11,9	-5,1	-1,0	-3,1	-3,3	4,0
21	56,3	-2,7	-5,8	-5,4	-8,7	-2,8	-6,6	-8,4	-9,5	-1,3
22	53,3	-1,2	-8,2	-8,0	-6,1	-6,8	-11,2	-9,4	-13,8	-10,1
23	54,2	-5,9	-6,3	-7,0	-4,7	0,5	-12,9	-0,9	-5,9	-40,9
24	51,6	-5,8	-7,4	-4,7	-9,2	-2,5	-4,7	-2,1	-5,3	-9,6
25	69,6	8,4	9,5	5,7	5,3	-4,2	-3,1	0,2	3,8	1,6
26	62,9	5,8	7,3	5,0	10,9	-0,5	1,8	-4,8	-6,7	-6,8
27	60,2	6,4	9,6	3,6	11,6	-0,6	0,3	-0,4	-4,7	-3,5
28	56,8	-3,5	-13,1	-1,9	-2,2	11,2	5,9	6,6	2,3	-12,9
29	48,6	-1,2	8,2	7,9	8,7	-0,4	-2,5	-3,2	-4,0	-6,0

