

PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PAR *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* MILIEU A BASE DE JUS DE DATTE

BOUDJELAL Amel

Département de Biochimie, Université Badji Mokhtar
Annaba, Algérie

Abstract

The use of date juice as substrate for lactic acid production was investigated. Lactobacillus rhamnosus was examined as possible production. The batch cultures were realized to optimise culture medium and to study the nutritional requirement of the strain. These studies have allowed to describe the effects of carbon substrate, nitrogen substrate and salts.

Date juice as carbon source was found to be satisfactory at a concentration of 60g/l. As date juice alone is a poor nitrogen source and salts for Lactobacillus rhamnosus, different supplementations, such as yeast extract, MgSO₄, MnSO₄, FeSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄ and tween 80 have been proposed. The production of lactic acid was increased with respect to non supplemented date juice. Effectively with date juice supplemented a satisfactory lactic acid concentration 43.5 g/l was obtained compared to 45 g/l with MRS.

Key words: Dates, lactic acid, *Lactobacillus rhamnosus*, fermentation.

1. INTRODUCTION

L'industrie agro-alimentaire génère d'importantes quantités de déchets. Le secteur phoenicole algérien, en particulier, fournit à chaque campagne près de 60.000 tonnes de déchets de datte [5]. Ils proviennent soit directement des palmeraies, soit des écarts des stations de conditionnement. Ces fruits qui sont déficients en matières azotées (entre 1.5 et 3% du poids), sont dotés de teneurs élevées en sucres tels que le glucose, le fructose et le saccharose (entre 60 et 70% du poids) [10]. Ils contiennent également des lipides, des éléments minéraux et des vitamines [1].

Les dattes de part leur grande richesse en sucres et leur conservation relativement longue [14], offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel elles sont soumises. En effet, elles peuvent servir en tant que matière première de fermentation pour la production de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'oxytétracycline, l'alcool, la vitamine B₁₂, les protéines d'organismes unicellulaires, les ferments lactiques et la levure de boulangerie [2], [13], [7], [10], [11], [12].

L'acide lactique est un acide organique naturel, trouve diverses applications dans les industries chimiques, alimentaires et pharmaceutiques [9]. Il trouve également de nouvelles applications

potentielles notamment dans la production de polymères biodégradables [6].

La production d'acide lactique par des micro-organismes s'est très bien développée depuis 25 ans et souvent ce sont des procédés qui utilisent des substrats relativement coûteux tels que l'extrait de levure, le glucose ou le lactose. Actuellement, différentes matières premières sont utilisées industriellement (lactoserum ou mélasses).

En ce qui concerne la production d'acide lactique, si un grand nombre de milieux a été mis au point et étudié avec d'autres produits ou sous produits [9], [8], [3] aucun travail de ce type n'a été réalisé avec la datte.

L'objectif de ce travail porte d'une part, sur l'exploration du jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*, et d'autre part, améliorer les performances de production par l'étude d'une supplémentation du jus de datte (source d'azote et de sels minéraux).

MATERIEL ET METHODES

Micro-organisme

La souche utilisée dans ce travail est *Lactobacillus rhamnosus*. Elle nous a été fournie par le groupe Rhône Poulenc de France (LBC80 10D). Elle est stockée dans le milieu MRS avec 10% de

glycérol et conservée à -20°C . La composition du milieu est la suivante (g/l) : peptone, 10 ; extrait de viande, 10 ; extrait de levure, 5 ; K_2HPO_4 , 2 ; $\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 5 ; citrate d'ammonium, 2 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 ; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 ; glucose, 20. Tween 80 (1ml). Le pH du milieu prêt à l'emploi est de 6.5.

Préparation de l'inoculum

La phase de réactivation est réalisée par deux repiquages successives à partir du tube de conservation (38°C pendant 24h) sur milieu MRS liquide [4].

Extraction du jus de datte

Les dattes sont lavées et dénoyautées. L'eau est rajoutée à raison de deux litres par kilogramme de pulpes de dattes. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 h. L'extrait de jus obtenu est centrifugé à 5000 rpm pendant 30 mn afin de séparer les débris celluloses. Le surnageant recueilli est utilisé essentiellement en tant que source de carbone avant d'être dilué aux proportions convenables. Les sucres totaux sont exprimés en glucose.

Fermentations

Les fermentations ont été réalisées soit en erlenmeyers de 250 ml avec un volume utile de 100 ml inoculés et incubés à 38°C pendant 24h et à 200 rpm, soit dans un réacteur LKB de 6 litres avec un volume de travail de 3 litres équipé d'un contrôle d'agitation (200 rpm), de température (38°C) et de pH (6), ce dernier est maintenu par addition automatique de NH_4OH (5M).

L'évolution de la biomasse, la consommation du glucose et la production d'acide lactique sont suivis à des intervalles de temps réguliers.

Méthodes d'analyses

La concentration de biomasse est déterminée par mesure de la densité optique à 570 nm. L'acide lactique est déterminé par titrage de l'acidité avec du NaOH 0.1N. Le glucose est déterminé par une méthode enzymatique utilisant l'autanalyseur Technicon II.

RESULTATS ET DISCUSSION

Effet de la concentration initiale des sucres du jus de datte

Cinq concentrations de sucres totaux du jus de datte ont été testées (10, 20, 40, 60 et 80 g/l). Les résultats obtenus dans le tableau 1, montrent que le jus de datte est favorable à la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

Tableau 1. Effet de la concentration initiale des sucres totaux du jus de datte sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| Sucres totaux du jus de datte (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| Contrôle | 5.8 | 45 |
| 10 | 1.45 | 9 |
| 20 | 1.55 | 25 |
| 40 | 2.04 | 28 |
| 60 | 2.24 | 30 |
| 80 | 2.23 | 30 |

Contrôle = milieu MRS liquide.

La biomasse et la et la production d'acide lactique augmentent avec les sucres totaux du jus de datte atteignant un maximum quand le milieu de fermentation contient 60g/l de sucres totaux. La production est nettement plus faible que celle obtenue avec le milieu MRS d'ou l'intérêt d'un enrichissement.

Etude d'une supplémentation en sels minéraux

Cinq sels ont été retenus pour leurs effet positifs sur la croissance et la production d'acide lactique : MgSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 . Les résultats obtenus (tableau 2, 3, 4, 5 et 6) montrent que la biomasse et la production d'acide lactique augmentent avec l'ajout de chaque sel.

Tableau 2. Effet de l'ajout du $MgSO_4$ sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| $MgSO_4$ (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------|-------------------|----------------------------|
| 0 | 2.30 | 26 |
| 0.1 | 2.60 | 32 |
| 0.2 | 2.95 | 34 |
| 0.4 | 2.90 | 34 |
| 0.6 | 2.94 | 34 |

Tableau 3. Effet de l'ajout du $MnSO_4$ sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| $MnSO_4$ (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 | 2.50 | 29 |
| 0.01 | 2.75 | 32 |
| 0.02 | 2.80 | 35 |
| 0.03 | 2.82 | 35 |
| 0.04 | 2.79 | 34 |

Tableau 4. Effet de l'ajout du $FeSO_4$ sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| $FeSO_4$ (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------|-------------------|----------------------------|
| 0 | 2.60 | 30 |
| 0.01 | 2.65 | 32 |
| 0.02 | 2.75 | 34 |
| 0.03 | 2.90 | 36 |
| 0.04 | 2.70 | 36 |
| 0.05 | 2.85 | 36 |

Tableau 5. Effet de l'ajout du K_2HPO_4 et du KH_2PO_4 sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------------------------|-------------------|----------------------------|
| 0/0 | 2.60 | 30 |
| 0.1/0.1 | 2.80 | 33 |
| 0.2/0.2 | 2.95 | 34 |
| 0.3/0.3 | 3.05 | 36 |
| 0.4/0.4 | 3.20 | 36 |
| 0.5/0.5 | 3.35 | 38 |
| 0.6/0.6 | 3.34 | 38 |
| 0.8/0.8 | 3.34 | 38 |

Effet de l'ajout du tween 80

Le tween 80 permet une meilleure excrétion du lactate par la cellule en créant des pores dans la membrane. C'est en effet avec cette fermentation que les meilleurs résultats ont été obtenus (tableau 6).

Tableau 6 . Effet de l'ajout du tween 80 sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| tween 80 (ml/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|--------------------|-------------------|----------------------------|
| 0 | 2.70 | 36 |
| 0.5 | 2.75 | 37 |
| 1.0 | 2.80 | 40 |
| 1.5 | 2.79 | 40 |
| 2.0 | 2.78 | 40 |

Etude d'une supplémentation en source d'azote

Afin d'améliorer la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*, le jus de datte a été enrichi avec différentes concentrations en extrait de levure (0 , 5, 10, 20 et 30 g/l). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7 . Effet de l'ajout de l'extrait de levure sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*.

| Extrait de levure (g/l) | Biomasse (g/l) | Acide lactique (g/l) |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------|
| 0 | 2.20 | 30 |
| 5 | 3.98 | 35 |
| 10 | 5.27 | 40 |
| 20 | 5.81 | 43.5 |
| 30 | 5.80 | 43 |

Une supplémentation azotée est indispensable pour un gain de performances comparée au jus de datte non enrichi.

Etude des conditions de culture

Effet de la température sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* Quatre fermentations ont été réalisées pour étudier l'effet de la température sur les différents paramètres cinétiques (30° C, 38° C, 42° C et 45° C). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 8

Tableau 8. Comparaison des paramètres cinétiques à différentes températures.

| Températures (° C) | μ_{max} (h ⁻¹) | X _{max} (g/l) | μ_p (h ⁻¹) | Lactate max (g/l) | Pv (g/l.h) | Ps (g/h.h) |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|--------------|--------------|
| 30 | 0.210 | 13.575 | 0.925 | 35 | 0.400 | 0.375 |
| 38 | 0.310 | 15.400 | 1.160 | 45 | 0.480 | 0.420 |
| 42 | 0.280 | 15.000 | 1.025 | 42 | 0.414 | 0.400 |
| 45 | 0.230 | 14.250 | 0.975 | 40 | 0.375 | 0.395 |

μ_{max} : vitesse spécifique maximale de croissance.

X_{max} : concentration maximale en biomasse.

μ_p : vitesse spécifique de croissance.

Pv : productivité volumétrique.

Ps : productivité spécifique.

Effet du pH sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus*. Plusieurs fermentations en mode discontinu

ont été menées avec et sans régulation du pH. Les résultats obtenus sont dans le tableau 9. Une régulation du pH est nécessaire.

Tableau 9. Comparaison des paramètres cinétiques avec et sans régulation du pH

| pH | μ_{max} (h ⁻¹) | X _{max} (g/l) | μ_p (h ⁻¹) | μ_s (h ⁻¹) | Lactate max (g/l) | Pv (g/l.h) | Ps (g/h.h) |
|------------|--------------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|--------------|--------------|
| 5.0 | 0.134 | 9.775 | 1.100 | 0.660 | 35 | 0.314 | 0.125 |
| 5.5 | 0.210 | 14.825 | 1.250 | 0.825 | 40 | 0.414 | 0.385 |
| 6.0 | 0.260 | 15.425 | 2.270 | 0.980 | 47 | 0.487 | 0.402 |
| 6.5 | 0.224 | 15.110 | 1.660 | 0.845 | 44 | 0.425 | 0.475 |
| Non régulé | 0.114 | 8.525 | 0.862 | 0.400 | 32 | 0.232 | 0.109 |

μ_{max} : vitesse spécifique maximale de croissance.

X_{max} : concentration maximale en biomasse.

μ_p : vitesse spécifique de croissance.

μ_s : Vitesse spécifique de consommation.

Pv : productivité volumétrique.

Ps : productivité spécifique.

CONCLUSION

Nous avons mis au point un milieu de culture à base de jus de datte avec la composition suivante (g/l) : sucres totaux, 60 ; MgSO₄, 0.2 ; MnSO₄, 0.03 ; FeSO₄, 0.03 ; K₂HPO₄/ KH₂PO₄, 0.5; extrait de levure, 20. Tween 80 (1ml). Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 15mn. Le pH du milieu prêt à l'emploi est de 6.0.

Ce milieu permet une production de 43.5 g/l d'acide lactique ce qui est satisfaisant sachant qu'avec le milieu MRS la production atteinte est de 45g/l.

REFERENCES BIOLILOGIQUES

- 1-Abou-zeid, A.A., N.A ; Baeskin et A.O. Baghlaf, (1993). Utilization of date products in production of oxytetracycline by *Streptomyces rimosus*. J.Chem.Tech. Biotechnol., **58**, 77 - 79.
- 2-Abou-zeid, A.A., et S.M.Khoja, (1993). Utilization of date in the fermentative formation of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. Zentrabl. Microbiol., **148**, 213 - 221.
- 3-Aeshchlimann, A. et U.Von Stochar, (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Appl.Microbiol.Biotehnl., **32**, 398 - 402.

- 4-Anonyme, (1987). Rapport du groupe inter-ministériel chargé d'étudier les possibilités de la valorisation de la dattes non consommée en l'état.
- 5-Cheng, P., R.E.Muller, S. Jaeger, R.Bajpai et E.L.Iannotti, (1991). Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J.Ind.Microbiol.*, 7, 27 - 34.
- 6-El - Akidi Hassen, H., (1982). Les sucres de dattes, les fermentations et les domaines d'applications dans le monde arabe. Séminaire sur les sucres de dattes, 4 - 9 Décembre, 100 - 111.
- 7-Heriban, V., E. Sturdik, L.Zalibera et P.Matus, (1993). Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Appl.Microbiol.*, 16, 243-246.
- 8-Hujanen, M.et Y.Y.Linko, (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 307-313.
- 9-Kamel, B.S., (1979). Dates as a potential substrate for single cell protein production. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, 1, 180 -182.
- 10-Nancib, N.A. Nancib, et J.Boudrant, (1997). Use of waste products in the fermentative formation of baker's yeast biomass by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.*, 60, 67-71.
- 11-Nancib, N. M.Ghoul, L. Larous, A. Nancib, L. Adimi, M.Remmal, et J.Boudrant, (1999). Use of date products in the production of the thermophilic dairy starter strain *Streptococcus thermophilus*. *Biores. Technol.*, 67, 291-295.
- 12- Nemroud, D., (1982). Le laboratoire pilote d'extraction et de commercialisation des sucres de dattes. Séminaire sur les sucres de dattes, 4-9 Décembre, Bagdad, 211-219.
- 13- Sawaya, W.N., H.A.Khatchadourian, J.K. Khalil, W.M.Safi et A.Al-Shalhat, (1982). Growth and compositional changes during the various developmental stages of some Saudi Arabian date cultivars. *J.Food Sci.*, 47, 1489-1497.