

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

N°/SNV/2018

THÈSE

Présentée par

TAMINE Milouda

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: MICROBIOLOGIE

THÈME

**Production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sur
jus de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*)**

Soutenue publiquement le 18/04/2019

DEVANT LE JURY

Président :	HARZALLAH Daoud	Pr. UFA Sétif 1
Directeur de thèse :	NANCIB Nabil	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs :	BAKOUR Rabah	Pr. USTHB
	BEKKI Abdelkader	Pr. UAB Oran 1
	NANCIB Aïcha	MCA. UFA Sétif 1

Avant-propos

En tout premier lieu, je remercie Allah, tout puissant, de m'avoir donné la force, la santé et la persistance pour mener à terme ce travail.

Je souhaite remercier en premier lieu mon directeur de thèse, Professeur Nabil Nancib, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Je lui suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques et sa franchise. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. Qu'il trouve ici toute ma gratitude. J'ai été particulièrement touchée par sa rigueur scientifique et l'attention qu'il m'a accordée malgré ses multiples obligations.

Je remercie vivement madame NANCIB Aïcha maitre de conférence A pour sa grande contribution à mes travaux de recherche, pour son aide précieuse, pour ses compétences scientifiques, pour ses conseils scientifiques précieux, pour ses encouragements et sa bonne humeur.

A vous madame, merci pour votre patience, votre compréhension et tout votre soutien.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ma recherche en acceptant d'évaluer mon travail et de l'enrichir par leurs propositions:

- M. HARZALLAH Daoud, Professeur à l'Université Ferhat Abbas de Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait d'avoir accepté de présider le Jury,
- M. BAKOUR Rabah, Professeur à USTHB,
- M. BEKKI Abdelkadar, Professeur à UES-Senia Oran,
- MM. NANCIB Aïcha maitre de conférences A à l'Université Ferhat Abbas de Sétif 1.

Que les membres de jury trouvent ici l'expression de mes vifs remerciements pour avoir bien voulu juger ce travail malgré leurs nombreuses occupations.

Je suis également redevable à mes parents, ma belle famille, mes amis qui n'ont cessé de me soutenir. Que ma mère, mon père, mon époux ainsi que mes frères et sœurs trouvent ici mes sincères remerciements pour leur soutien sans faille et leurs encouragements.

A toi Sofiane merci pour ton aide, ta patience et ta compréhension.

A toi Khadidja merci.

A toi Yahia-Youcef merci.

A vous Farida j'exprime mes chaleureux remerciements pour votre aide précieuse et votre encouragement.

Enfin, je tiens à remercier tous mes amis et compagnons de laboratoire ainsi que mes camarades de ma promotion pour avoir su m'écouter, m'encourager tout au long de cette grande aventure. Merci à Mr Mouffok A., Asma, Naassa, Fatima, Nora, Zineb, Oumaima, Rafika, Hanane, Naima, Abdelouahab et spécialement Lina et tous les autres.

SOMMAIRE

Avant propos

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Résumés

INTRODUCTION 1

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE FIGUIER DE BARBARIE (*OPUNTIA FICUS INDICA*)(*OFI*) 4

1. Biologie d'*Opuntia ficus indica* 4

2. Distribution géographique 5

3. Métabolisme et physiologie de la plante 6

4. Composition du figuier de barbarie 7

4.1. Les acides aminés, les vitamines et les carotènes 8

4.2. Les sels minéraux 10

4.3. Les lipides et les composés phénoliques 11

4.4. Les pigments 14

4.5. Les composés volatiles 14

5. Composition lignocellulosique de l'*OFI* 15

6. Prétraitement et hydrolyse de la matière lignocellulosique 17

6.1. Le prétraitement 17

6.2. L'hydrolyse 18

6.2.1. Hydrolyse acide 18

6.2.1.1. Hydrolyse par un acide dilué 18

6.2.1.2. Hydrolyse par un acide concentré 19

6.2.2. Hydrolyse enzymatique 19

7. Les principales utilisations du figuier de barbarie 20

7.1. Intérêt nutritionnel 20

7.2. Production de fourrage pour le bétail 22

7.3. Utilisation du cactus dans l'apiculture 22

7.4. Production de carmin 22

7.5. Utilisation médicinale	22
7.5.1. Utilisations traditionnelles	22
7.5.2. Effet pharmacologique	23
7.5.2.1. Effet anti-ulcère	23
7.5.2.2. Effet anti-inflammatoire et analgésique	23
7.5.2.3. Effet neuroprotecteur	23
7.5.2. 4. Effet anti-cancereux	24
7.5.2.5. Effet anti-viral	24
7.5.2.6. Effet anti-alcool	24
7.5.2.7. Effet anti-diabétique	24
7.5.2.8. Effet anti-hyperlipidémique et hypercholestérolémique	25
7.6. Valorisation biotechnologique	25
7.6.1. Production de bioéthanol	25
7.6.2. Production de vin	25
7.6.3. Biofloculant	25
7.7. Utilisation cosmétique	25
II. LES BACTERIES LACTIQUES	29
1. Définition des bactéries lactiques	29
2. Utilisations des bactéries lactiques	29
3. Classification phylogénétique	34
4. Voies fermentaires générales des bactéries lactiques	38
4.1. Voie homofermentaire	38
4.2. Voie hétérofermentaire	40
5. Métabolisme carboné chez les bactéries lactiques	42
5.1. Transport des sucres	42
5.1.1. Le système perméase	42
5.1.2. Le système PTS	43
6. Facteurs affectants la fermentation lactique	44
6.1. Les besoins nutritionnels des bactéries lactiques	44
6.1.1. Besoins en vitamines	44
6.1.2. Besoins en acides aminés	45
6.1.3. Besoins en éléments minéraux	45
6.2. Influence du pH	45

6.3. Inhibition par le substrat	46
6.4. Inhibition par le produit	46
III. L'ACIDE LACTIQUE	47
1. Généralités	47
2. Propriétés physico-chimiques de l'acide lactique	47
3. Production d'acide lactique	48
3.1. Voie chimique	48
3.2. Voie fermentaire	49
4. Microorganismes producteurs d'acide lactique	50
4.1. Les bactéries	50
4.1.1. Les lactobacilles	50
4.1.2. Les bacilles	51
4.1.3. Les lactocoques	51
4.1.4. Les corynébactéries	51
4.1.5. Culture mixte	53
4.2. Les champignons	55
4.3. Les levures	55
5. Applications de l'acide lactique	55
5.1. L'industrie des polymères	55
5.2. L'industrie alimentaire	57
5.3. L'industrie cosmétique	57
5.4. L'industrie pharmaceutique	58
5.5. L'industrie chimique	58
5.6. Autres utilisations	59
6. Les matières premières utilisées pour la production d'acide lactique	59
6.1. Les monosaccharides et les disaccharides	60
6.2. Les polysaccharides	60
IV. LES PLANS D'EXPERIENCES	62
1. Généralités	62
1.1. Notion d'espace expérimental	63
1.2. Notion de surface de réponse	63
1.3. Notion de modélisation mathématique	64
2. Types de plans d'expériences	65

2.1. Plans de criblage	65
2.1.1. Les plans de Plackett et Burmann	65
2.1.2. Les plans de Taguchi	65
2.1.3. Plans sursaturés	66
2.1.4. Plans factoriels complets	66
2.2. Plans de modélisation	66
2.2.1. Les plans composites centrés	66
2.2.2. Les plans de Box-Behnken	67
2.2.3. Les plans hybrides	68
2.2.4. Les plans de Doelhart	69
2.2.5. Plans de Roquemore	69
2.2.6. Les plans D-optimaux	69

DEUXIEME PARTIE: MATERIELS ET METHODES

1. Souches utilisées	70
2. Milieux de culture	70
2.1. Milieux de préculture	70
2.2. Milieux de production d'acide lactique	72
2.3. Milieux de dénombrement bactérien	73
3. Stérilisation	74
4. Appareils et produits chimiques	77
5. Matériel végétal	77
5.1. Description du matériel végétal	77
5.2. Prélèvement des échantillons	77
5.3. Préparation du jus de fruit d' <i>OFI</i> et de la poudre des cladodes	77
5.3.1. Préparation du jus de fruit d' <i>OFI</i>	77
5.3.2. Préparation de la poudre des cladodes	78
5.3.2.1. Hydrolyse acide	79
5.3.2.2. Hydrolyse enzymatique	79
6. Procédure de culture	79
6.1. Conservation des souches	79
6.2. Préparation des précultures	79
6.3. Fermentations en cultures discontinues	80
7. Méthodes d'analyse	80

7.1. Estimation de la biomasse	80
7.1.1. Turbidimétrie	80
7.1.2. Dénombrement des cellules bactériennes	80
7.2. Dosage des sucres	81
7.2.1. Dosage des sucres totaux	81
7.2.2. Dosage des sucres réducteurs	81
7.2.3. Dosage du glucose	82
7.3. Dosage de l'acide lactique	82
7.3.1. Méthode de Taylor	82
7.3.2. Acidité Dornic	82
7.4. Dosage des protéines	83
7.5. Méthodologie de surface de réponse et analyse statistique	83
7.6. Calcul des paramètres cinétiques	88
7.6.1. Vitesse spécifique maximale de croissance	88
7.6.2. Productivité volumique	88
7.6.3. Rendement de bioconversion	89

TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION

I. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE SUR JUS DE FRUIT D'OFI	90
1. Production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435 sur jus de fruit d'OFI	91
1.1. Effet de la concentration initiale des sucres du jus de fruit d'OFI sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	91
1.2. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 19435	95
2. Production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d'OFI	98
2.1. Effet de l'ajout des sels sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	98
2.2. Optimisation de la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d'OFI	101
2.2.1. Optimisation des conditions de culture	102
2.2.2. Validation du modèle	104
2.3. Effet de l'ajout de différentes sources azotées sur la production d'acide lactique	111

par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>OFI</i>	
2.4. Effet combinée de sources azotées sur la production d'acide lactique à partir de jus de fruit d' <i>OFI</i> par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	114
2.5. Effet de l'ajout des vitamines sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>OFI</i>	117
II. HYDROLYSE DES CLADODES D'<i>OPUNTIA FICUS INDICA</i> (<i>OFI</i>)	121
1. Hydrolyse acide des cladodes	121
1.1. Effet de l'acide sulfurique sur l'hydrolyse acide des cladodes	121
2. Optimisation des conditions de l'hydrolyse des cladodes par l'acide sulfurique	121
2.1. Analyse statistique	121
2.2. Optimisation de l'hydrolyse acide des cladodes d' <i>OFI</i>	125
3. Effet de différents types d'hydrolyse sur la production des sucres réducteurs	129
III. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE SUR HYDROLYSAT DE CLADODES d'<i>OFI</i>	130
1. Production d'acide lactique sur hydrolysate acide de cladodes d'<i>OFI</i> par <i>Lactococcus lactis</i> 19435	131
2. Production d'acide lactique sur hydrolysate d'<i>OFI</i> par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	133
2.1. Effet de différents types d'hydrolysats des cladodes sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	133
2.2. Production d'acide lactique sur hydrolysate enzymatique des cladodes par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	136
2.2.1. Effet de la source azotée sur la production d'acide lactique sur hydrolysate enzymatique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	136
2.2.2. Effet du carbonate de calcium sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysate enzymatique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	138
2.2.3. Effet des sels minéraux et de la source azotée sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysate enzymatique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	140
2.3. Production d'acide lactique sur hydrolysate acide des cladodes par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	142
2.3.1. Effet de la détoxification de l'hydrolysate acide des cladodes sur la production d'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	142

2.3.2. Effet de l'ajout des sels et des sources azotées sur la production d'acide lactique sur hydrolysate acide détoxifié par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	145
2.3.2.1. Effet de l'ajout de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique sur hydrolysate acide détoxifié par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	145
2.3.2.2. Effet de l'ajout des sels sur la production d'acide lactique sur hydrolysate acide détoxifié par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	149
2.3.2.3. Substitution de l'azote totale de l'extrait de levure par des sources azotées de faibles coûts et leur effet sur la production d'acide lactique sur hydrolysate acide détoxifié	152
3. Production d'acide lactique sur un milieu contenant un mélange de jus de fruit et d'hydrolysate acide détoxifié par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20)	154
VI. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE EN CULTURE PURE ET MIXTE	158
1. Production d'acide lactique en culture pure	158
1.1. Production d'acide lactique sur jus de fruit et sur hydrolysate acide des cladodes par <i>Lactobacillus casei</i> isolée de leben	160
1.2. Production d'acide lactique sur jus de fruit et sur hydrolysate acide des cladodes par <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262	163
2. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'OFI en culture mixte	163
2.1. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'OFI en culture mixte par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc20) et <i>Lactobacillus casei</i>	163
2.2. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'OFI en culture mixte par <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) et <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262	166
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	170
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition chimique des cladodes et de la pulpe de fruit d' <i>Opuntia</i> spp (Feugang et <i>al.</i> , 2006).	8
Tableau 2. Teneur en acides aminés dans la graine, la raquette et le fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> . Les teneurs en acides aminés sont exprimés en g/100 g de matière sèche (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	9
Tableau 3. Teneur en vitamines des différentes parties de la plante d' <i>Opuntia ficus indica</i> (fruit, raquette, et graine). La teneur en vitamines est exprimée en mg/100 g de tissu) (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	10
Tableau 4. Teneur en éléments minéraux dans les différentes parties de la plante d' <i>Opuntia ficus indica</i> . Les composés minéraux sont exprimés en mg/100 g (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	11
Tableau 5. Teneur en phytostérols des différentes parties du fruit de l'espèce <i>Opuntia ficus indica</i> (pulpe, graines et peau). Les teneurs en stérol sont exprimées en g/kg) (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	12
Tableau 6. La distribution et la quantité des phénols et des flavonoïdes présente dans les différentes parties d' <i>Opuntia ficus indica</i> (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	12
Tableau 7. Composition de la matière lignocellulosique (Van Maris et <i>al.</i> , 2006).	16
Tableau 8. Principaux procédés de prétraitement (Verardi et <i>al.</i> , 2012).	17
Tableau 9. Produits et co-produits de fruits et de cladodes de figuier de barbarie (Feugang et <i>al.</i> , 2006; Jana, 2012).	21
Tableau 10. Les effets bioactifs majeurs des préparations de cactus dans les différents modes expérimentales (El-Mostafa et <i>al.</i> , 2014).	26
Tableau 11. Bactéries lactiques utilisées comme culture initiale dans les aliments fermentés (Florou-Paneri et <i>al.</i> , 2013).	31
Tableau 12. Exemples de bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des aliments (Drouault et Corthier, 2001).	33
Tableau 13. Espèces <i>Lactobacillus</i> (Coeuret et <i>al.</i> , 2003).	36
Tableau 14. Caractéristiques des microorganismes producteurs d'acide lactique (Litchfield et <i>al.</i> , 2009).	54
Tableau 15. Les différentes applications des PLA (Vijayakumar et <i>al.</i> , 2008).	57
Tableau 16. Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs.	68
Tableau 17. Composition du milieu M17.	70
Tableau 18. Composition du milieu MRS.	71

Tableau 19. Composition du milieu BMGC.	71
Tableau 20. Composition du milieu M17 agar.	73
Tableau 21. Composition du milieu MRS agar.	73
Tableau 22. Composition du milieu LB.	74
Tableau 23. Niveaux des facteurs étudiés par le plan composite centré pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide.	84
Tableau 24. Niveaux des facteurs étudiés par le plan composite centré pour l'optimisation de la production d'acide lactique.	85
Tableau 25. Matrice expérimentale du plan composite centré pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide.	86
Tableau 26. Matrice expérimentale du modèle composite centre pour l'optimisation de la production d'acide lactique.	87
Tableau 27. Constituants du fruit cru d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	90
Tableau 28. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 à différentes concentrations initiales en sucres totaux du jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	94
Tableau 29. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 sur (jus de fruit seul), (jus de fruit + les sels) et (jus de fruit + les sels + l'extrait de levure).	97
Tableau 30. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> seul ou supplémenté avec les sels	101
Tableau 31. Niveaux des facteurs sélectionnés	102
Tableau 32. Matrice expérimentale du modèle composite centré montrant les valeurs réelles ainsi que les valeurs expérimentales et prédites de la concentration en acide lactique.	107
Tableau 33. ANOVA pour les surfaces de réponse du modèle quadratique obtenu à partir de conceptions expérimentales.	108
Tableau 34. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>Opuntia fucus indica</i> suplémenté par différentes sources azotées.	114
Tableau 35. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> supplémenté par plusieurs combinaisons de sources azotées à des proportions différentes.	118
Tableau 36. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> supplémenté par différentes proportions azotées (extrait de levure/urée) avec ou sans vitamines du groupe B.	119

Tableau 37. Matrice expérimentale du modèle composite centré montrant les réponses mesurées et les réponses estimées des sucres totaux.	124
Tableau 38. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle composite centré.	125
Tableau 39. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle composite centré.	127
Tableau 40. Constituants des cladodes d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	130
Tableau 41. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> 19435 sur différents milieux de culture à base d'hydrolysate acide (hydrolysate acide seul, hydrolysate acide + sels, hydrolysate acide + jus de fruit + sels).	133
Tableau 42. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur différents types d'hydrolysats.	136
Tableau 43. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur hydrolysate acide détoxifié ou non détoxifié.	145
Tableau 44. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> sur hydrolysate acide détoxifié à différentes concentrations initiales en extrait de levure.	148
Tableau 45. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur hydrolysate acide détoxifié supplémenté soit par les sels et l'extrait de levure soit par l'extrait de levure seulement.	151
Tableau 46. Paramètres cinétiques durant la croissance de <i>Lactococcus lactis</i> isolée à partir du lait de chamelle sur un mélange du jus de fruit et jus de raquette.	154
Tableau 47. Paramètres cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) sur un mélange du jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> et d'hydrolysate acide des cladodes.	157
Tableau 48. Paramètres cinétiques de <i>C.glutamicum</i> sur jus de fruit d'OFI et sur hydrolysate acide détoxifié des cladodes d'OFI.	160
Tableau 49. Paramètres cinétiques de <i>Corynebacterium glutamicum</i> 2262 sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> et sur hydrolysate acide des cladodes.	163
Tableau 50. Paramètres cinétiques de la culture mixte de <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) et <i>Lactobacillus casei</i> sur le jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	166
Tableau 51. Paramètres cinétiques de la culture mixte de <i>Lactococcus lactis</i> (Lc 20) et <i>Corynebacterium glutamicum</i> sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	169

Liste des figures

- Figure 1.** La plante d'*Opuntia ficus indica* (A) Raquette, (B) fruit, (C) fleur 5
(<http://www.jardinsdepapounet.fr/Web%20EU/almanach-2014-a/page-mai-au-jardin-bio-2014.html>).
- Figure 2.** Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde 6
(<http://www.discoverlife.org>).
- Figure 3.** Cycle photosynthétique des plantes de type CAM 7
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fe/CAM_cycle).
- Figure 4.** Structure générale de: (a) acide bétalamique (b) bétacyanine (c) bétaxantine 14
(El-Mostafa et *al.*, 2014).
- Figure 5.** Représentation de la structure lignocellulosique montrant les fractions 15
d'hémicellulose, de cellulose et de lignine (Mussatto et Teixeira, 2010).
- Figure 6.** Structure du mucilage d'*Opuntia ficus indica* (Sàenz et *al.*, 2004). 16
- Figure 7.** Prétraitement de la matière lignocellulotique (Idi et Eva Mohamed, 2011). 18
- Figure 8.** Structures du 2-furfural et du 5-hydroxymethylfurfural (Wertz et *al.*, 2016). 19
- Figure 9.** Mode d'action des cellulases sur la cellulose (Mussatto et Teixeira, 2010). 20
- Figure 10.** Usages et ingrédients fonctionnels des bactéries lactiques (Florou-Paneri et 33
al., 2013).
- Figure 11.** *Lactococcus lactis* (<http://zenkefir.blogspot.com/2011/03/so-what-is-milk-kefir-part-2.html>). 35
- Figure 12.** *Lactobacillus casei* (<https://www.flickr.com/photos/ajc1/8344600413>). 38
- Figure 13.** La voie homofermentaire de la fermentation du glucose chez les bactéries 40
lactiques (Martinez et *al.*, 2013).
- Figure 14.** La voie hétérofermentaire de la fermentation du glucose chez les bactéries 41
lactiques (Martinez et *al.*, 2013).
- Figure 15.** Différents types de systèmes de transport des sucres (Aarnikunnas, 2006). 42
- Figure 16.** Système PTS (Aarnikunnas, 2006). 44
- Figure 17.** Structure tridimensionnelle des deux formes isomériques de l'acide lactique 48
(Martinez et *al.*, 2013).
- Figure 18.** Représentation schématique de deux processus de production d'acide 50
lactique (Komesu et *al.*, 2017).
- Figure 19.** *Corynebacterium glutamicum*. 52
(https://whymashen.files.wordpress.com/2011/03/coryne_sem.jpg)
- Figure 20.** Voie de synthèse du lactate chez *Corynebacterium glutamicum*. 52
- Figure 21.** Les voies de polymérisation vers l'acide poly-lactique (Henton et *al.*, 2005). 56

Figure 22. Cycle du poly-lactique acide dans la nature (Xiao et <i>al.</i> , 2012)	56
Figure 23. Potentiels produits technologiques de l'acide lactique (Vijayakumar et <i>al.</i> , 2008).	59
Figure 24. Matières lignocellulosiques utilisées pour la production d'acide lactique (Ghaffar et <i>al.</i> , 2014).	61
Figure 25. Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).	63
Figure 26. Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).	64
Figure 27. Plan de composite centré pour trois facteurs (Goupy, 2006).	67
Figure 28. Représentation des étapes de séchage de fruits d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	78
Figure 29. Représentation des étapes de séchage des raquettes d' <i>Opuntia ficus indica</i> .	78
Figure 30. Réaction de réduction de DNS.	82
Figure 31. Représentation d'appareillage utilisé pour la titration	83
Figure 32 (A,B,C). Cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435 à différents concentrations initiales en sucres totaux du jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> . (A) : croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435, (B) : consommation des sucres, (C) : production d'acide lactique.	93
Figure 33. Effet de la concentration initiale des sucres totaux d' <i>Opuntia ficus indica</i> sur la production et la productivité de l'acide lactique par <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435.	94
Figure 34. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur les cinétiques de croissance de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435	96
Figure 35. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique et le taux de consommation des sucres après 53 h de culture par <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 19435.	97
Figure 36. (A,B,C). Cinétiques de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Lc 20) sur jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> seul ou supplémenté avec les sels. (A) : croissance de <i>Lactococcus lactis</i> , (B) : consommation des sucres, (C) : production d'acide lactique	100
Figure 37. Graphique des valeurs estimées en fonction des valeurs mesurées.	108
Figure 38. Diagramme de Pareto montrant les effets de différentes variables indépendantes sur la concentration d'acide lactique	109
Figure 39. Courbes de surfaces de réponses (3D) montrant l'effet de différentes variables sur la production d'acide lactique. (A) : effet des sucres réducteurs et de l'extrait de levure, (B) : effet des sucres réducteurs et de l'âge d'inoculum, (C) : effet de	110

l'extrait de levure et de l'âge d'inoculum.

Figure 40. Cinétiques de croissance (●), de consommation des sucres (▲) et de production d'acide lactique (□) par *Lactococcus lactis* sous les conditions optimales (une concentration de sucres réducteurs de 60 g/l, une concentration d'extrait de levure de 11 g/l et un âge d'inoculum de 10 heures). 111

Figure 41 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes sources azotées. (A): croissance de *Lactococcus lactis*, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 113

Figure 42 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par plusieurs combinaisons de sources azotées à des proportions différentes. (A): croissance de *Lactococcus lactis* (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique 117

Figure 43 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes proportions azotées (extrait de levure/urée) avec ou sans vitamines du groupe B. et des vitamines du groupe B. (A): croissance de *Lactococcus lactis*, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 120

Figure 44 (A,B,C). Courbes de surfaces de réponses (a) et de contours (b) montrant l'effet de différents variables sur l'hydrolyse acide des cladodes d'*OFI* (A): Effet de la concentration d'acide sulfurique et la température de prétraitement sur la concentration des sucres réducteurs, (B): Effet de la concentration d'acide sulfurique et le temps de prétraitement sur la concentration des sucres réducteurs, (C): Effet du temps et la température de prétraitement sur la concentration des sucres réducteurs. 128

Figure 45. Concentration des sucres réducteurs en fonction de différents types d'hydrolyse. (HA) : hydrolyse acide, (HE): hydrolyse enzymatique, (HE + HA) : hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse acide, (HA + HE) : hydrolyse acide suivie par une hydrolyse enzymatique. 129

Figure 46. Cinétiques de croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (19435) sur différents milieux de culture à base d'hydrolysate acide. 132

Figure 47. Production de l'acide lactique sur différents milieux de culture à base d'hydrolysate acide. 132

Figure 48. Concentrations d'acide lactique et rendements de bioconversion en fonction de différents types d'hydrolysats de cladodes par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20). 135

Figure 49. Productivités volumiques de production d'acide lactique en fonction de 135

différents types d'hydrolysats de cladodes par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20).

Figure 50. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation de sucres par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats enzymatiques supplémentés par différentes sources azotées 138

Figure 51. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats enzymatiques avec et sans ajout de CaCO₃ 140

Figure 52. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres sur hydrolysats enzymatiques supplémentés soit par l'extrait de levure soit par le sulfate d'ammonium. 142

Figure 53 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats détoxifiés et non détoxifiés. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 144

Figure 54 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats acides détoxifiés à différentes concentrations initiales en extrait de levure. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 147

Figure 55. Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats acides détoxifiés supplémentés soit par les sels et l'extrait de levure soit par l'extrait de levure seulement. 150

Figure 56 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats acides détoxifiés supplémentés par différentes sources azotées. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 153

Figure 57 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* (Lc 20) sur un mélange de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysats acides des cladodes. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 156

Figure 58 (A,B). Cinétique de *Lactobacillus casei* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysats acides des cladodes. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. 159

Figure 59 (A,B,C). Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysats acides des cladodes. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique 162

Figure 60 (A,B). Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei*. (A): production d'acide lactique, (B): consommation des sucres 165

Figure 61 (A,B). Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des 168
sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc
20) et *Corynebacterium glutamicum*. (A): production d'acide lactique, (B):
consommation des sucres

يهدف هذا العمل لإكشاف إمكانيات *Opuntia ficus indica* (OFI) كمادة خام لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

يركز الجزء الأول على استخدام عصير فاكهة OFI كمصدر للكربون لإنتاج حمض اللبن من قبل *Lactococcus lactis* 19435 و (*Lactococcus lactis* (Lc20) معزولة من حليب النوق. تم إجراء العديد من عمليات تخمير غير المستمر لغرض دراسة المتطلبات الغذائية لهاتين السلالتين. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن إثراء الوسط الذي أساسه عصير فاكهة OFI بالأملاح المعدنية ومستخلص الخميرة أدى إلى تحسين إنتاج حمض اللبن بنسبة 53.8٪ بواسطة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. تحسن في إنتاج حمض اللبن بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc20) تم تسجيله أيضا بعد إضافة الأملاح المعدنية. في هذه الحالة الأخيرة، الشروط المثلى لإنتاج حمض اللبن التي حددها النموذج composite centré في وسط أساسه عصير فاكهة OFI بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20) هي كالتالي: سكريات مرجعة (60 غ / لتر)، مستخلص الخميرة (11 غ / لتر)، سن اللقاح (10 ساعات). تم اختبار ومقارنة مصادر أزوت مختلفة على هذا الوسط. حيث أظهرت النتائج أن مستخلص الخميرة هو المصدر الأكثر فعالية. ومع ذلك، يبدو أن كبريتات الأمونيوم هو بديل جيد له وذلك من أجل خفض تكلفة إضافة مستخلص الخميرة. الاستخدام الجزئي لمستخلص الخميرة مع اليوريا بالإضافة إلى فيتامينات (ب) يبدو أيضًا طريقة مهمة للحد من إضافة مستخلص الخميرة.

و خصص الجزء الثاني لإيجاد القيم المثلى لشروط إمامة سيقان التين الشوكي باستخدام النموذج الإحصائي composite centré وكانت أفضل الشروط التي حددها النموذج هي: حمض الكبريت (6.8٪)، وقت ما قبل المعالجة (92.4 دقيقة).

أما الجزء الثالث فقد خصص لاستخدام حلامة سيقان التين الشوكي كمصدر كربون لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20) وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الحلامة ملائمة لنمو وإنتاج حمض اللبن. إضافة $CaCO_3$ ، خلاصة الخميرة والأملاح المعدنية للوسط الذي أساسه حلامة سيقان التين الشوكي حسنت إنتاج حمض اللبن بنسبة 20.4٪. كما أظهرت النتائج أيضا أن كبريتات الأمونيوم يمكن أن تكون بديلا ممكنا لمستخلص الخميرة. إزالة السموم من الحلامة الحمضية بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم وإضافة خلاصة الخميرة والأملاح المعدنية ساعد على تحسين إنتاج حمض اللبن. لتقليل التكلفة مرتبطة بإضافة مستخلص الخميرة. تمت إضافة corn steep إلى الحلامة منزوعة السمية. هذا سمح بالحصول على تركيز لحمض اللاكتيك قريب من ذلك الذي تم الحصول عليه باستعمال مستخلص الخميرة. وبالتالي يمكن أن يحل ال corn steep محل مستخلص الخميرة كمصدر للأزوت. تمت دراسة إنتاج حمض اللاكتيك على وسط يحتوي على خليط من عصير الفاكهة والحلامة الحمضية لسيقان OFI بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20). أظهرت النتائج أن إنتاج حمض اللبن الذي تم الحصول عليه بشكل منفصل على عصير الفاكهة أو على الحلامة الحمضية أكبر من ذلك الذي تم الحصول عليه باستعمال الخليط.

وخصص الجزء الأخير لإنتاج حمض اللاكتيك على وسط أساسه عصير فاكهة *Opuntia ficus indica* في وسط نقي ومختلط. أظهرت النتائج أن إنتاج حمض اللبن في الوسط النقي أفضل من ذلك المتحصل عليه في الوسط المختلط.

الكلمات المفتاحية: التين الشوكي (*Opuntia ficus indica*)، *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*، التخمر، التحسين، حمض اللبن.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'explorer le potentiel d'*Opuntia ficus indica* (*OFI*) comme matière première pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

La première partie est basée sur l'utilisation du jus de fruit d'*OFI* en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* 19435 et *Lactococcus lactis* (LC20) isolé à partir du lait de chamelle. Plusieurs séries de fermentations en mode discontinu ont été réalisées afin d'étudier les besoins nutritionnels de ces deux souches. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement du milieu à base de jus de fruit d'*OFI* en sels minéraux et en extrait de levure a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 53,8% par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. Une amélioration de la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (LC20) a été également obtenue après ajout des sels minéraux. Dans ce dernier cas, les conditions optimales déterminées par le modèle composite centré sur le milieu à base de jus de fruit d'*OFI* par *Lactococcus lactis* (Lc 20) sont les suivantes : sucres réducteurs (60 g/l), extrait de levure (11 g/l), âge d'inoculum (10h). Différentes sources azotées ont été testées et comparées sur ce milieu. Les résultats ont montré que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace. Cependant, le sulfate d'ammonium semble être une bonne alternative pour réduire le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure. L'utilisation partielle de l'extrait de levure avec l'urée plus les vitamines du groupe B semble aussi une voie intéressante pour réduire l'ajout de l'extrait de levure.

La deuxième partie est consacrée à l'optimisation des conditions d'hydrolyse des cladodes en utilisant le modèle composite centré. Les optima de ces conditions déterminées par le modèle sont : acide sulfurique (6,8%), temps de prétraitement (92,4 mn).

La troisième partie est consacrée à l'utilisation de l'hydrolysate des cladodes en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (Lc 20). Les résultats obtenus ont montré que l'hydrolysate de cladodes est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique. L'ajout de CaCO₃, de l'extrait de levure et des sels minéraux au milieu à base d'hydrolysate enzymatique de cladodes a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 20,4%. Les résultats ont montré également que le sulfate d'ammonium pourrait être un substituant possible de l'extrait de levure.

La détoxification de l'hydrolysate acide par une solution de NaOH et l'ajout de l'extrait de levure et les sels minéraux ont permis d'améliorer la production d'acide lactique. Afin de réduire le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure, la liqueur de « corn steep » a été complétée au milieu à base d'hydrolysate acide détoxifié. Ceci a permis d'obtenir une concentration en acide lactique proche de celle obtenue avec l'extrait de levure. La liqueur de « corn steep » pourrait remplacer l'extrait de levure en tant que source azotée.

La production d'acide lactique sur un milieu contenant le mélange de jus de fruit et d'hydrolysate acide des cladodes a été étudiée par *Lactococcus lactis* (Lc 20). Les résultats ont montré que la production d'acide lactique obtenue séparément sur jus de fruit ou bien sur hydrolysate acide des cladodes est supérieure à celle obtenue sur le mélange.

Enfin, la dernière partie est consacrée à la production d'acide lactique sur un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture pure et mixte. Les résultats ont montré que les performances de production d'acide lactique en culture pure sont meilleures que celles obtenues en culture mixte.

Mots clés: Figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, fermentation, optimisation, acide lactique.

Abstract

The objective of this work is to explore the potential of *Opuntia ficus indica* (OFI) as raw material for the production of lactic acid by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

The first part is based on the utilisation of the fruit juice of OFI as carbon source for the production of lactic acid by *Lactococcus lactis* 19435 and *Lactococcus lactis* (Lc 20) isolated from the milk of female camel. Several series fermentations in batch mode were performed to study the nutritional needs for these two strains. The obtained results showed that the supplementation of the medium containing fruit juice of OFI with mineral salts and yeast extract allowed to improve the production of lactic acid of 53.8% by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. An improvement of the production of lactic acid by *Lactococcus lactis* (Lc 20) was obtained after addition of mineral salts. In this last case, the optimal conditions determined by the composite model on the medium with fruit juice of OFI by *Lactococcus lactis* (Lc 20) are the following ones: reducing sugars (60 g/l), yeast extract (11 g/l), age of inoculum (10 hours). Various nitrogenous sources were tested and compared on this medium. The results showed that the yeast extract is the most effective nitrogen source. However, the ammonium sulfate seems to be a good alternative to reduce the cost of the addition of yeast extract. The partial use of the yeast extract with the urea and the vitamins of the group B also seems an interesting way to reduce the addition of the yeast extract.

The second part is dedicated to the optimization of the conditions of hydrolysis of cladodes by using the composite model. The optima of these conditions determined by the model are: sulphuric acid (6.8 %), time of pretreatment (92.4 mn).

The third part is dedicated to the use of the hydrolysate of cladodes as carbon source for the production of lactic acid by *Lactococcus lactis* (Lc 20). The obtained results showed that the hydrolysate of cladodes is favorable to the growth and to the production of lactic acid. The addition of CaCO₃, the yeast extract and mineral salts in the medium containing hydrolysate enzymatic of cladodes allowed to improve the production of lactic acid of 20.4%. The results also showed that the sulfate of ammonium could be one substituting possible of the yeast extract.

The detoxification of the acid hydrolysate by a solution of NaOH and the addition of the yeast extract and mineral salts allowed to improve the production of lactic acid. To reduce the cost of the addition of the yeast extract, the corn steep liquor was supplemented in the medium containing hydrolysate acid detoxified. This allowed to obtain a concentration in lactic acid close to that obtained with the yeast extract. The corn steep liquor could replace the yeast extract of yeast as nitrogen source.

The production of lactic acid in the medium containing the mixture of fruit juice and of hydrolysate acid of cladodes was studied by *Lactococcus lactis* (Lc 20). The results showed them that the production of lactic acid obtained separately on fruit juice either on hydrolysate acid of cladodes is superior to that obtained on the mixture.

Finally, the last part is dedicated to the production of lactic acid in the medium containing fruit juice of *Opuntia ficus indica* in pure and mixed culture. The results showed that the performances of production of lactic acid in pure culture are better than those obtained in mixed culture.

Keywords: prickly pear (*Opuntia ficus indica*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, fermentation, optimization, lactic acid.

INTRODUCTION

L'acide lactique est l'un des acides organiques les plus importants, produit par des bactéries lactiques, découvert par un scientifique Suédois C.W. Scheel en 1780 dans le lait fermenté. L'acide lactique est synthétisé soit par voie chimique soit par voie microbienne, il se présente sous deux formes optiquement actives, la configuration L(+) ou lévogyre et la configuration D(-) ou dextrogyre. La synthèse chimique est le résultat d'un acide lactique racémique D-L (Quintero. et *al.*, 2012), tandis que la fermentation est une méthode efficace et attractive pour produire un stéréo-isomère d'acide lactique sur des substrats moins chers avec des microorganismes hautement productifs et un taux de conversion élevée (Djukic'-Vukovic' et *al.*, 2012).

Aujourd'hui, 90% de l'acide lactique total est produit par fermentation. La transformation en acide lactique apparaît comme la plus prometteuse en raison de la relative ampleur du marché mondial de cet acide et de l'adéquation des microorganismes utilisés quotidiennement par diverses industries à cette bioconversion. Les débouchés pour l'acide lactique sont en effet importants et variés. L'acide lactique est présent dans l'industrie alimentaire, mais aussi dans l'industrie cosmétique, dans l'industrie textile, dans l'industrie chimique, dans l'industrie pharmaceutique ainsi que dans l'industrie des plastiques (Sheeladevi et Ramanathan, 2011).

Le marché de l'acide lactique devrait atteindre 3,82 milliards de dollars en 2020 et croit à un taux de 18% annuellement. Cependant, la production industrielle d'acide lactique n'a pas suivi la demande du marché. Cela est dû à plusieurs raisons, incluant le coût de la matière première. Cette dernière représente approximativement 68% du coût total de la production d'acide lactique (Djukic'-Vukovic' et *al.*, 2012). Actuellement, différentes matières premières à bon marché sont utilisées en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique : c'est le cas du lactosérum, des mélasses et des hydrolysats d'amidon (Hofvendahl et Hahn-Hagerdal, 2000). Puisque l'acide lactique est une molécule plateforme, la vente de ce bioproduit cible différentes industries et donc différents marchés à exploiter, surtout le marché des bioplastiques. Ce produit est donc un choix intéressant pour une valorisation du figuier de barbarie d'*Opuntia ficus indica*.

L'*Opuntia ficus indica* ou figuier de barbarie, est une plante de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism) qui présente des adaptations physiologiques et morphologiques, lui permettant de résister aux conditions difficiles des régions arides et semi arides. Dans certains pays, l'*Opuntia ficus indica* a fait l'objet d'une culture à part entière,

pour l'exploitation fourragère et maraichère. En effet, c'est une plante dont toutes les parties peuvent être consommées : les tiges (ou cladodes) et les fruits (Hadj Sadok, 2014). Vu la richesse de cette plante en nutriments, elle est utilisée dans l'alimentation de l'homme et du bétail. C'est une plante qui est économiquement importante, mais qui reste très peu exploitée. En plus de son apport nutritionnel dû à leur richesse en sucres, protéines, vitamines et sels minéraux et leur apport en substances bioactives (fibres, polyphénols et pigments) (Stintzing et al. 2001; Kabas et al., 2006; Jana 2012, Alimi et al., 2013), elle peut être valorisée en produits agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Arba, 2009). Ces produits à haute valeur ajoutée peuvent jouer un rôle socio-économique important. Du fait de sa richesse en éléments nutritifs cette plante constitue un excellent milieu de culture pour les microorganismes

Le processus d'optimisation est un sujet d'importance centrale dans toute recherche expérimentale et dans la production industrielle. Les exigences nutritionnelles ainsi que les conditions de culture peuvent être déterminés par la méthode conventionnelle (classique) ou la méthode statistique. Cette dernière offre plusieurs avantages: elle est rapide, fiable et permet de réduire le nombre d'expériences. Elle a été utilisée dans de nombreux procédés d'optimisation de la fermentation. L'approche expérimentale classique pour l'optimisation des milieux de culture implique le changement d'une seule variable à la fois en fixant les autres variables, elle est longue ; nécessite un grand nombre d'expériences. Un autre inconvénient caractérise cette approche; elle ne prend pas en compte les interactions entre les variables ce qui rend la détermination des optima impossible alors que l'approche statistique peut déterminer l'effet des variables et leur interaction avec un nombre limité d'essais.

Les plans d'expériences sont une méthodologie de choix pour répondre à cette préoccupation.

Il nous semble donc intéressant d'insérer notre travail dans ce contexte de recherche.

Le but principal de cette thèse est la valorisation du figuier de barbarie d'*Opuntia ficus indica* en tant que matière première pour la production d'acide lactique à partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

L'ensemble de ce travail est réparti en plusieurs parties:

Dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques en rapport avec le figuier de barbarie d'*Opuntia ficus indica*, les bactéries lactiques, l'acide lactique et les plans d'expériences.

Nous développerons dans la deuxième partie le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'étude.

La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus dans notre étude. Dans le cas de cette étude plusieurs objectifs ont été fixés à savoir :

- L'utilisation du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en tant que substrat pour la production d'acide lactique et l'optimisation du milieu de culture.
- L'optimisation des paramètres de l'hydrolyse de la matière lignocellulotique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* pour atteindre un rendement maximal en sucres réducteurs.
- L'utilisation de l'hydrolysate des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en tant que substrat pour la production d'acide lactique et l'optimisation du milieu de culture.
- Utilisation du mélange de jus de fruit et d'hydrolysate de cladodes d'*Opuntia ficus indica* pour la production d'acide lactique.
- Production d'acide lactique en culture pure et mixte sur milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

Une conclusion générale est donnée à la fin du présent travail en utilisant les principaux résultats obtenus. Ces derniers pourraient stimuler d'autres travaux de recherche.

PREMIERE PARTIE :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LE FIGUIER DE BARBARIE (*OPUNTIA FICUS INDICA*) (*OFI*)

1. Biologie d'*Opuntia ficus indica*

Le figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) est une plante grasse qui produit la figue de barbarie appartenant à la famille des cactacées. Elle appartient au règne des plantae, à l'ordre des Caryophyllales à la famille *Cactaceae*, à la sous famille des *Opuntiaceae*, genre *Opuntia* et à l'espèce *Opuntia ficus indica* (De Felice, 2004).

La famille des cactacées renferme environ 1500 espèces. L'espèce *Opuntia ficus indica* est la cactée qui a la plus grande importance agronomique, tant pour les fruits que pour les raquettes.

Le figuier de barbarie est une plante arborescente de 2 à 6 m de hauteur caractérisée par un tronc épais et ligneux, des tiges en forme de raquettes aplaties appelées cladodes, des épines, des fleurs et des fruits (Schweizer, 1997) (Figure 1).

Les raquettes ont une forme ovoïdale, de couleur verte, ayant une longueur de 30 à 50 cm et une épaisseur de 1,5 à 3 cm. Elles sont couvertes de petites aréoles, d'épines et de glochides blancs. Ces raquettes assurent la fonction chlorophyllienne (Feugang, 2006). La capacité des *cactaceae* de maintenir l'eau même dans des conditions climatiques défavorables est due à la hausse production de mucilage dans les cladodes et les fruits (Sáenz, 2004).

Le figuier de barbarie donne des fleurs au sommet des raquettes, de couleur jaune ou orange large de 4 à 10 cm. Ces fleurs donnent naissance à un fruit appelé figue de barbarie présent sous forme d'une grosse baie ovoïde et charnue, ornée de petites épines (Piga, 2004). Le fruit est généralement verdâtre, mais prend une couleur variant du jaune clair au rouge violacé à maturité.

Généralement, la plante fleurit en avril et mai et le fruit est cueilli fin juillet à septembre.



Figure 1. La plante d'*Opuntia ficus indica* (A) raquette, (B) fruit, (C) fleur

(<http://www.jardinsdepapounet.fr/Web%20EU/almanach-2014-a/page-mai-au-jardin-bio-2014.html>).

2. Distribution géographique

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique. Sa distribution géographique est localisée principalement dans: le Mexique, la Sicile, le Chili, le Brésil, la Turquie, la Corée, l'Argentine et l'Afrique du Nord (El-Mostafa et *al.*, 2014).

Il a été introduit d'abord en Espagne et plus tard, au 16^{ème} siècle au Nord et au sud de l'Afrique. Il s'est diffusé rapidement dans le bassin méditerranéen (Malainine et *al.*, 2001). Il est développé sur la partie ouest de la Méditerranée: Sud de l'Espagne, le Portugal et l'Afrique du Nord (la Tunisie, l'Algérie et le Maroc) (Wallace et Gibson, 2002; Piga, 2004; Valente et *al.*, 2010).

La Figure 2, montre la distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde.

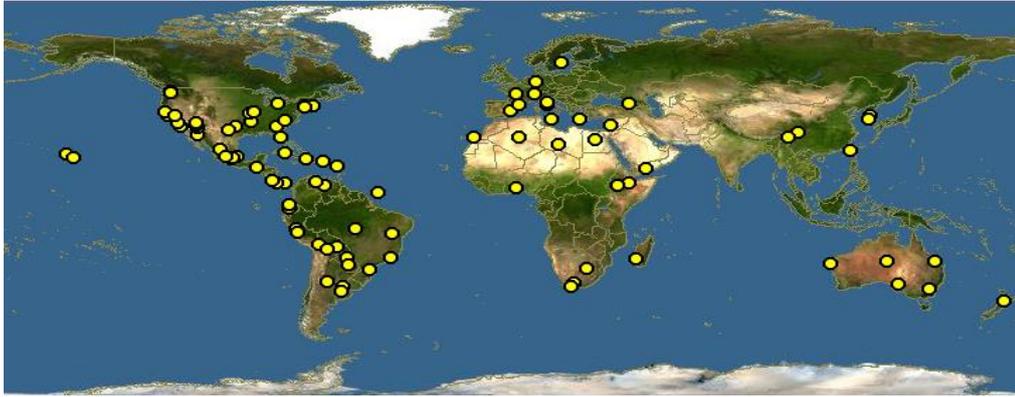


Figure 2. Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde (<http://www.discoverlife.org>).

3. Métabolisme et physiologie de la plante

L'adaptation du figuier de barbarie à la sécheresse est due à une photosynthèse de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism) (Figure 3). Le figuier de barbarie a la particularité de fixer le CO_2 et de libérer l' O_2 pendant la nuit et de fermer ses stomates pendant le jour. Ce dispositif permet une moindre perte d'eau par évapotranspiration pendant les heures les plus chaudes.

Pendant la nuit le CO_2 est fixé dans les tissus de chloroplaste par réaction avec le phosphoénolpyruvate, résultant du métabolisme des sucres via la glycolyse pour donner l'oxaloacétate.

Cet élément est à son tour transformé en malate pour être stocké dans la vacuole, d'où le nom de plante à métabolisme acide. Pendant le jour, le malate se décompose en pyruvate et libère le CO_2 et l' H_2O directement au niveau des tissus chlorophylliens qui s'en servent pour la suite de photosynthèse (Black et Osmond, 2003; Arba 2009).

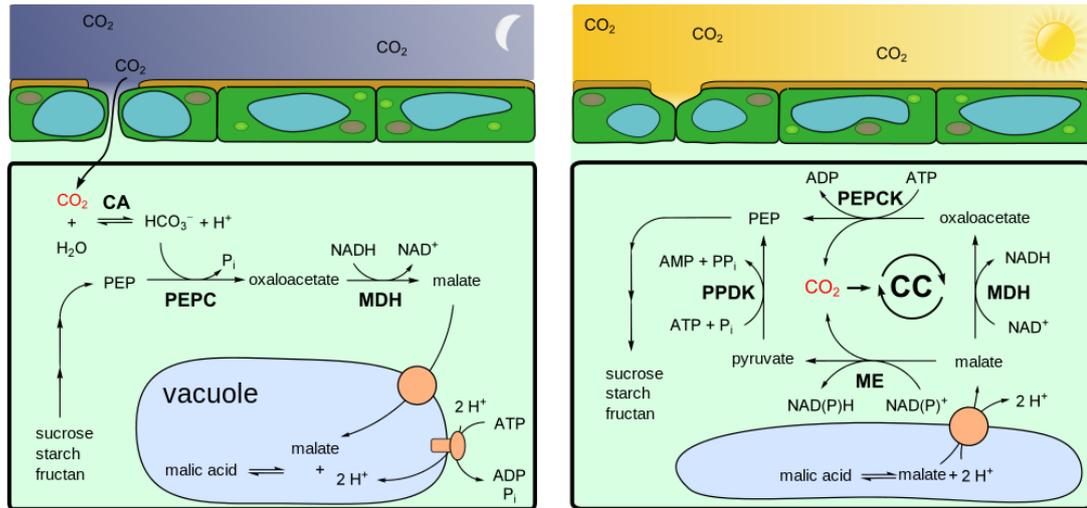


Figure 3. Cycle photosynthétique des plantes de type CAM(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fe/CAM_cycle)

1. Composition du figier de barbarie

Les cladodes et les fruits d'*Opuntia* sont considérés comme une source importante de différents composés alimentaires (Tableau 1). La composition chimique des cladodes varie en fonction de l'endroit de la culture, la saison et l'âge de la plante et la variété de la plante (Sáenz, 1995; Felker et al., 2005). Les cladodes sont riche en pectine, en mucilage et en élément minéraux. Par contre, les fruits sont riche en vitamines, en acides aminés et en betalaines (Feuang et al., 2006).

Les fruits de cactus contiennent une teneur en acide ascorbique qui varie de 20 à 40 mg/100 g de poids frais, une acidité titrable de 0,03 à 0,12% et un pH varie de 5,0 à 6,6 (Feuang et al., 2006). La teneur des composés solubles varie de 12-17% est supérieure à celle présente dans d'autres fruits, comme les pruneaux, les abricots et les pêches (Sepulveda et Sáenz, 1990).

Les graines contiennent essentiellement d'arabinane dans l'endosperme et de D-Xylane dans leur peau (Feuang et al., 2006).

Tableau 1. Composition chimique des cladodes et de la pulpe de fruit d'*Opuntia* spp (Feugang et al., 2006).

Constituants	Poids sec des cladodes	Poids frais	
		Cladodes (g/100g)	Pulpe de fruit (%)
Eau	-	88-95	84-90
Glucides	64-71	3-7	12-17
Cendres	19-23	1-2	0,3-1
Fibres	18	1-2	0,02-3,15
Protéines	4-10	0,5-1	0,21-1,6
Lipides	1-4	0,2	0,09-0,7

4.1. Les acides aminés, et les vitamines

Le fruit contient des teneurs élevés en acides aminés en particulier, la proline, la taurine, et la sérine (Stintzing et al., 2001; Stintzing et al., 2005) (Tableau 2).

Au niveau de la raquette, le principal acide aminé est la glutamine, suivie par la leucine, la lysine, la valine, l'arginine, la phénylalanine et l'isoleucine (Tableau 2).

Au niveau de la graine, l'acide aminé prédominant est l'acide glutamique suivi par la leucine, la sérine, la lysine (Lee et al., 2005).

La peau de fruit est riche en vitamine E avec des quantités allant jusqu'à 17,6 g/kg d' α -tocophérol (Tableau 3) (El-Mostafa et al., 2014). Par contre, l'huile extraite de graines du fruit a une faible teneur en vitamine E (0,403 g/kg) et dans la majorité des cas il s'agit de γ -tocophérol (0,330 g/kg) (Tableau 3) (Ramadan et al., 2003b; El-Mostafa et al., 2014). Le fruit d'*Opuntia ficus indica* contient 180 à 300 mg.kg⁻¹ de vitamine C (Mobhammer et al., 2006). La quantité de vitamine C présente dans les fruits de cactus est supérieure à celle présente dans d'autres fruits comme la pomme, la poire, le raisin et la banane. La vitamine C est présente dans toutes les parties du fruit allant de 0,5 à 1 g/kg (Piga, 2004). Par contre les

autres vitamines comme les caroténoïdes, la thiamine, la riboflavine, et la niacine se trouvent seulement dans la raquette sous forme de traces (Sepúlveda and Sáenz, 1990).

Tableau 2. Teneur en acides aminés dans la graine, la raquette et le fruit d'*Opuntia ficus indica*. Les teneurs en acides aminés sont exprimés en g/100 g de matière sèche (El-Mostafa et al., 2014).

Acides aminés	Raquette	Fruit	Graine
Alanine	1,25	3,17	4,75
Arginine	5,01	1,11	6,63
Asparagine	3,13	1,51	Trace
Acide aspartique	4,38	Trace	10,42
Acide glutamique	5,43	2,40	21,68
Glutamine	36,12	12,59	Trace
Cystine	1,04	0,41	0,37
Histidine	4,18	1,64	3,11
Isoleucine	3,97	1,13	6,20
Leucine	2,71	0,75	9,94
Lysine	5,22	0,63	6,79
Méthionine	2,92	2,01	0,70
Phénylalanine	3,55	0,85	5,25
Sérine	6,68	6,34	8,46
Thréonine	4,18	0,48	1,53
Tyrosine	1,46	0,45	3,09
Tryptophane	1,04	0,46	Trace
Valine	7,72	1,43	6,02
Acide α - aminobutyrique	Trace	0,04	Trace
Carnosine	Trace	0,21	Trace
Citrulline	Trace	0,59	Trace
Ornithine	Trace	Trace	Trace
Proline	Trace	46	Trace
Taurine	Trace	15,79	Trace
Glycine	Trace	Trace	5,06

Tableau 3. Teneur en vitamines des différentes parties de la plante d'*Opuntia ficus indica*. La teneur en vitamines est exprimée en mg/100 g de tissu) (El-Mostafa et al., 2014).

Vitamines	Pulpe	Graine	Peau	Raquette
Vitamine K1	53,2	52,5	109
Vitamine C	34-40	7-22
Vitamine B1	0,14
Vitamine B2	0,6
Vitamine B3	0,46
α -Tocophérol	84,9	56	1760
β -Tocophérol	12,6	12	222
γ -Tocophérol	7,9	33	174
σ -Tocophérol	422	5	26
Vitamine E totale	527,4	106	2182

4.2. Les sels minéraux

La pulpe de fruit contient des éléments minéraux en quantité relativement importantes, notamment le magnésium, le calcium et le potassium (Stintzing et al., 2001) (Tableau 4). Les graines de fruit sont riches en minéraux avec une prédominance de potassium et de phosphore respectivement, suivi par du magnésium, du sodium et du calcium (Tableau 4). Les cladodes contiennent principalement du calcium et du potassium (Tableau 4).

Tableau 4. Teneur en éléments minéraux dans les différentes parties de la plante d'*Opuntia ficus indica*. Les composés minéraux sont exprimés en mg/100 g (El-Mostafa et al., 2014).

Principaux éléments identifiés	Pulpe	Graine	Cladodes
Calcium	27,6	16,2	5,64- 17,95
Oxalate de calcium	11,5- 4,3
Magnésium	27,7	74,8	8,80
Sodium	0,8	67,6	0,3- 0,4
Potassium	161	163	2,35- 55,20
Fer	1,5	9,45	0,09
Phosphate	152	0,15- 2,59
Zinc	1,45	0,08
Cuivre	0,32
Manganèse	Trace	0,19- 0,29

4.3. Les lipides et les composés phénoliques

La pulpe de fruit possède une faible teneur en huile (0,1-1,0%), représenté par 8,70 g des lipides totaux/kg de poids sec de la pulpe par apport à 98,8 g des lipides totaux/kg dans les graines (Ramadan et Mörsel, 2003a). L'acide linoléique est l'acide gras dominant dans les huiles de la pulpe de fruit suivi par l'acide palmitique et l'acide oléique. En effet, les acide gras polyinsaturé γ -linoléique et α -inolénique sont détectés en quantités plus élevées (Mobhammer et al., 2006). Le principal stérol présent dans les huiles de la pulpe est le β -sitostérol suivi par le campésterol. Ces deux stérols représentent environ 90% des stérols totaux de la pulpe (Tableau 5).

Les analyses chromatographiques des lipides totaux extraites des raquettes de cactus (Abidi et al., 2009) montrent que l'acide palmitique (C16:0), l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linolénique (C18: 3) représentent respectivement, 13,87 ; 11,16 ; 34,87 et 32,83% de la teneur en acides gras totaux.

Toutes les parties de la plante de cactus sont riches en composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques (Tableau 6) (El-Mostafa et al., 2014).

Dans la pulpe de fruit, la teneur en phénols totaux est de 218,8 mg/100 g, avec une teneur élevée en glycosides isorhamnétines (50,6 mg/100 g). Les raquettes sont riches en nocotiflorine (Tableau 6).

Plusieurs auteurs ont montré que le taux de la matière grasse dans la pulpe de la figue de barbarie est de 0,5%. Ils sont une excellente source d'acides gras, tels que l'acide linoléique et l'acide oléique, qui sont les principaux acides présents, suivie par l'acide palmitique.

Tableau 5. Teneur en phytostérols des différentes parties du fruit de l'espèce *Opuntia ficus indica* (pulpe, graines et peau). Les teneurs en stérol sont exprimées en g/kg (El-Mostafa et al., 2014).

Principaux composés identifiés	Pulpe	Graine	Peau
Campesterol	8,74	1,66	8,76
Stigmasterol	0,73	0,30	2,12
Lanosterol	0,76	0,28	1,66
β -Sitosterol	11,2	6,75	21,1
Δ^5 -Avenasterol, Δ^7 -Avenasterol	1,43	0,29	2,71
Δ^7 -Avenasterol	0,05
Ergosterol	0,68

Tableau 6. La distribution et la quantité des phénols et des flavonoïdes présente dans les différentes parties d'*Opuntia ficus indica* (El-Mostafa et al., 2014).

Parties de la plante	Principaux composés identifiés	Quantité en mg/ 100g
La fleur	Acide gallique	1630- 4900
	Quercetine 3- <i>O</i> -Rutinoside	709
	4 Kaempferol 3- <i>O</i> - Rutinoside	400
	5 Quercetine 3- <i>O</i> - Glucoside	447
	6 Isorhamnetine 3- <i>O</i> - Robinobioside	4269
	7 Isorhamnetine 3- <i>O</i> - Galactoside	979
	8 Isorhamnetine 3- <i>O</i> - Glucoside	724
	9 Kaempferol 3- <i>O</i> -Arabinoside	324

Suite du Tableau 6.

Parties de la plante	Principaux composés identifiés	Quantité en mg/ 100g
La pulpe	Les acides phénoliques totaux	218,8 9
	Quercétine	4,94
	Isorhamnetine	0,78
	Kaempferole	0,84
	Lutioline	50,6
	Isorhamnetine glycosides	2,7
	kaempférole	
La graine	Les acides phénoliques totaux	48-89 7,36-17,62
	Feruloyl- sucrose isomer 1	2,9-17,1
	Feruloyl- sucrose isomer 2	12,6-23,4
	Sinapoyl-diglucoside	1,5-2,6
	Les flavonoïdes totaux	4,1-6,6
	Les tannins totaux	
La peau de fruit	Les acides phénoliques totaux	45,7.10 ³ 6,95
	Les flavonoïdes totaux	0,22
	Kaempférol	4,32
	Quercétine	2,41-91
	Isorhamnétine	
Les raquettes	Acide gallique	0,64-2,37
	Acide coumarique	14,08-16,18
	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque	0,06-5,02
	Acide 4-hydroxybenzoïque	0,5-4,72
	Acide férulique	0,56-34,77
	Acide salicylique	0,58-3,54
	Isoquercétine	2,29-39,67

Suite du tableau 16.

Parties de la plante	Principaux composés identifiés	Quantité en mg/ 100g
Les raquettes	Isorhamnetine 3-O-glucoside	4,59-32,21
	Nicotiflorine	2,89-146,5
	Rutine	2,36-26,17
	Narcissine	14,69-137,1

4.4. Les Pigments

La pulpe de fruit de cactus offre différentes couleurs basées sur la betalaine sur une gamme étendue de blanc au pourpre avec une teneur de 66 à 1140 mg/kg de pulpe de fruit (Stintzing et al., 2005). Le fruit et la fleur de cactus contiennent le jaune betaxanthine et le rouge betacyanines (Figure 4)(Butera et al., 2002; Stintzing et al., 2005; Mobhammer et al., 2006).

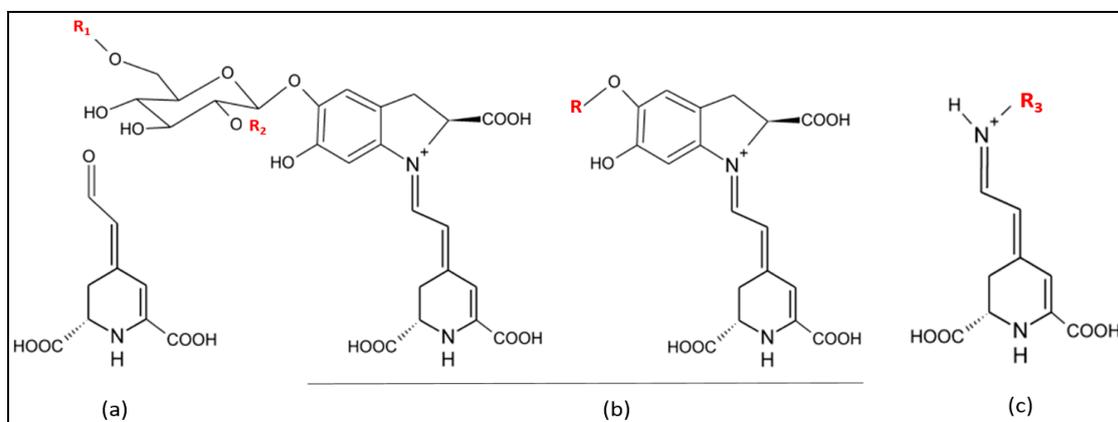


Figure 4. Structure générale de: (a) acide bétalamique (b) bétacyanine (c) bétaxantine (El-Mostafa et al., 2014).

4.5. Les composés volatiles

Les composants volatils sont mineurs, mais néanmoins des constituants importants. Ils donnent la saveur aux fruits de la figue de barbarie. L'éthanol représente la proportion principale (76,33%) (Saenz, 2000; Piga, 2004).

5. Composition lignocellulosique d'*Opuntia ficus indica*

La matière lignocellulosique se compose principalement de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine et de pectine (Figure 5) (Tableau 7). La cellulose forme un squelette qui est entouré par l'hémicellulose et la lignine (Mussatto et Teixeira, 2010). Les cladodes d'*Opuntia ficus indica* contiennent approximativement 22% de cellulose, 13% d'hémicellulose et 34% d'acide polysaccharidique (mucilage et pectine) (Malainine *et al.*, 2005). La cellulose est un polymère linéaire constituée de plusieurs centaines de monomères de glucose liés par des liaisons glucosidiques $\beta(1-4)$ et elle est habituellement arrangée en structures microcristallines qui sont très difficiles de les dissoudre ou de les hydrolyser sous les conditions naturelles.

L'hémicellulose est un hétéropolysaccharide composé de pentoses (xylose, arabinose), d'hexoses (mannose, glucose, galactose) et d'acide glucuronique (Kuhad *et al.* 1997). Les sucres sont liés par des liaisons $\beta-1-4$ -glucosidiques. Elle a un faible poids moléculaire et elle est plus soluble que la cellulose du à son contenu en monosaccharides. La composition de l'hémicellulose varie selon l'origine de la plante.

La lignine est un polymère fortement irrégulier et insoluble constituée des sous unités de phenylpropanoïdes, à savoir *p*-hydroxyphenyl (H-type), guaiacyl (G-type)(Olsson et Hahn-Häg, 1996).

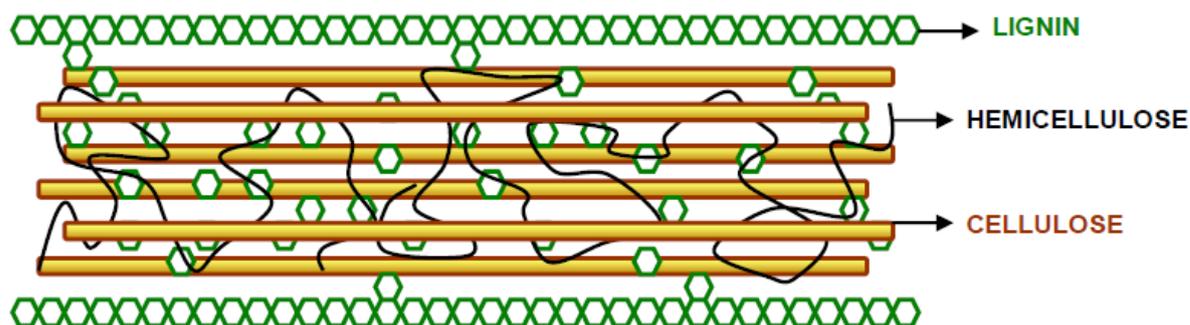


Figure 5. Représentation de la structure lignocellulosique montrant les fractions d'hémicellulose, de cellulose et de lignine (Mussatto et Teixeira, 2010).

Tableau 7. Composition de la matière lignocellulosique (Van Maris et al., 2006).

Fraction	Teneurs (%)	Les principaux monomères
Cellulose	33-51	Glucose
Hemicellulose	19-34	Glucose, mannose, galactose, xylose et arabinose
Lignine	20-30	Alcool aromatique
Pectine	2-20	Acide galacturonique et rhamnose

Le mucilage est un polysaccharide de pectine caractéristique des membres de la famille de *cactaceae* (Nobel et al., 1992). Il a une grande capacité d'absorber de l'eau. Il peut être considéré comme une source potentielle pour l'industrie des hydrocolloïdes. Il contient différentes proportions en sucres tels que L-arabinose, D-galactose, L-rhamnose, et D-xylose (Trachtenberg et Mayer, 1981; Nobel et al., 1992).

La première structure proposée pour le mucilage (Figure 6) décrit la molécule comme une chaîne centrale linéaire répétée de(1→4) lié α-D-acide galacturonique et (1→2) lié β-L-rhamnose avec les chaînes latérales de (1→6)-β-D-galactose attaché au O-4 des résidus de rhamnose. Les résidus de galactose présentent des substitutions en positions O-3, ou double substitution en O-3 et O-4 (Sàenz et al., 2004).

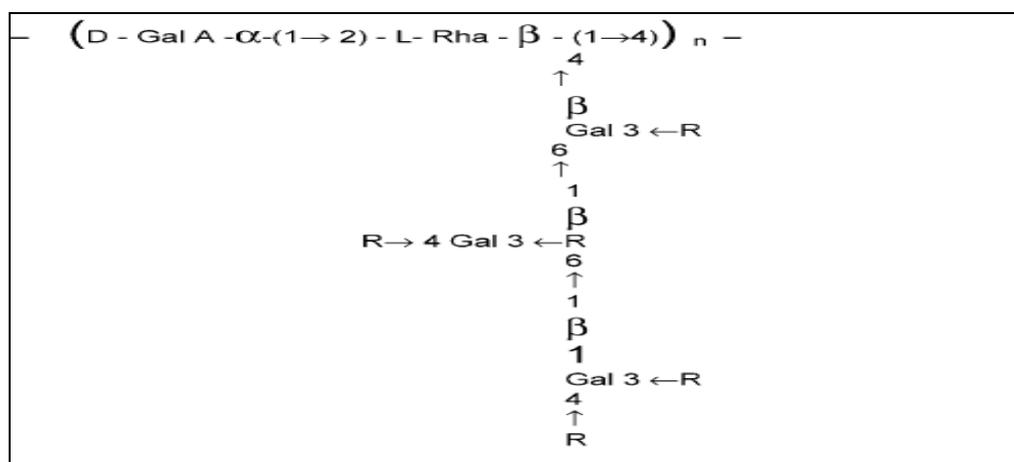


Figure 6. Structure du mucilage *d'Opuntia ficus indica* (Sàenz et al., 2004).

R: arabinose ou xylose

6. Prétraitement et hydrolyse de la matière lignocellulosique

Le prétraitement et l'hydrolyse de la matière lignocellulosique en sucres fermentescibles est un processus intensif qui implique la combinaison de prétraitement (chimique et mécanique) et d'hydrolyse (chimique et enzymatique) (Van Maris et *al.*, 2006).

6.1. Le prétraitement

Le Prétraitement est nécessaire pour rendre la lignocellulose accessible pour l'hydrolyse (Figure 7) (Klinke et *al.* 2004). Cet objectif peut être atteint de plusieurs manières: en abaissant la teneur en lignine et en hémicellulose du substrat solide à traiter, en augmentant la porosité de la matrice, en diminuant la cristallinité de la cellulose ou en augmentant sa surface spécifique. En fonction du type de prétraitement, ces actions peuvent être conjuguées. Les principales contraintes de cette étape sont d'éviter la perte ou la dégradation des sucres et de limiter la formation de produits inhibiteurs ainsi que les rejets. De nombreuses techniques de prétraitement ont été étudiées et proposées (Tableau 8) (Van Maris et *al.*, 2006).

Tableau 8. Principaux procédés de prétraitement (Verardi et *al.*,2012).

Procédés physiques	Prétraitement mécanique Thermolyse
Procédés physico-chimiques	Thermohydrolyse Explosion à la vapeur Explosion à la vapeur en conditions acides AFEX Explosion au CO ₂
Procédés chimiques	Prétraitement à l'acide dilué Prétraitement alcalin Procédé Organosolv Oxydation chimique Oxydation biologique

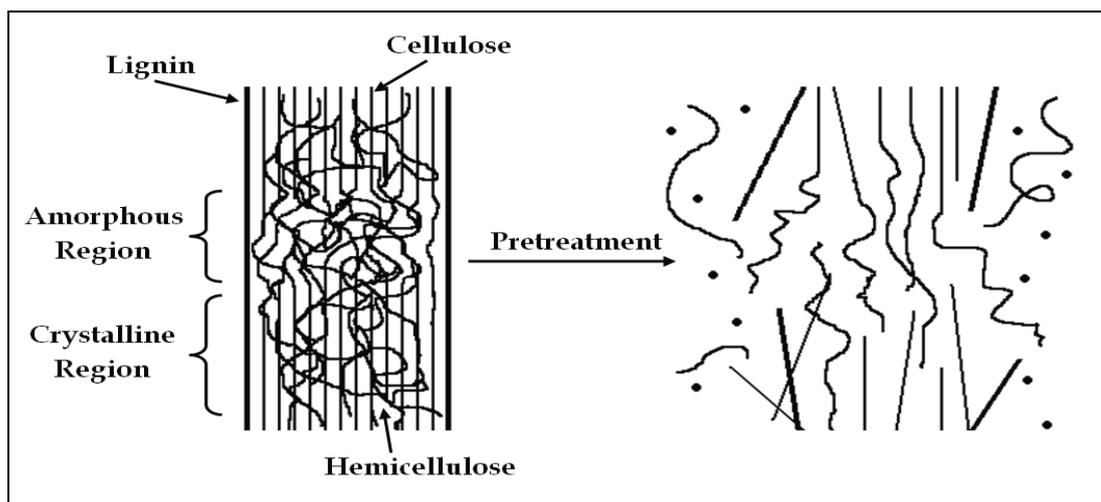


Figure 7. Prétraitement de la matière lignocellulotique (Idi et Eva Mohamed, 2011).

6.2. L'hydrolyse

Du fait de la structure de la cellulose, de sa cristallinité et de son association avec la lignine et les hémicelluloses encore présents, même après l'étape de prétraitement, son hydrolyse en monomères fermentescibles est une opération difficile qui peut être réalisée par deux méthodes: hydrolyse chimique catalysée par un acide ou hydrolyse enzymatique par l'utilisation des enzymes cellulolytiques spécifiques (Van Maris *et al.*, 2006).

6.2.1. Hydrolyse acide

6.2.1.1. Hydrolyse par un acide dilué

L'hydrolyse par un acide dilué est effectuée de préférence en présence d'acide sulfurique ou d'acide chlorhydrique dilué (Verardi et *al.*, 2012). La première étape est exécutée à des températures basses et permet de digérer les hémicelluloses et de solubiliser les sucres qui en sont issus (Ong, 2004). Après séparation, la fraction solide est soumise à une nouvelle hydrolyse à des températures élevées (Ong, 2004). Cette technique permet une hydrolyse des hémicelluloses en monomères et augmente la digestibilité de la cellulose (des rendements d'hydrolyse enzymatique supérieurs à 90% ont été obtenus dans certains cas) bien que le degré de cristallinité de la cellulose ne soit pas modifié (Kumar et *al.*, 2009). Une partie de la lignine serait également solubilisée. A des températures élevées, les sucres forment des composés furaniques inhibiteurs dans la fermentation microbienne principalement le furfural

en provenance des pentoses et le 5-hydroxyméthylfurfural en provenance des hexoses (Figure 8) (Wertz et al., 2016).

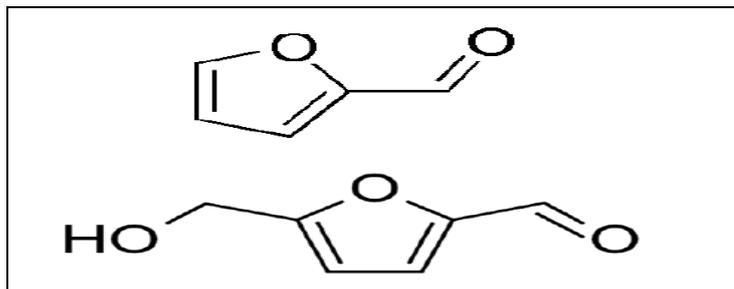


Figure 8. Structures du 2-furfural (au-dessus) et du 5-hydroxyméthylfurfural (en-dessous) (Wertz et al., 2016).

6.2.1.2. Hydrolyse par un acide concentré

L'hydrolyse par un acide concentré est généralement plus employée pour traiter les matières lignocellulosiques car elle constitue un agent puissant d'hydrolyse de la cellulose. De plus, aucune enzyme n'est nécessaire après l'hydrolyse acide. Cependant, les acides concentrés sont toxiques, corrosifs, dangereux et requièrent des réacteurs qui résistent à la corrosion. De plus, l'acide concentré doit être récupéré après hydrolyse (Sun et Cheng, 2002). Les avantages de l'hydrolyse par l'acide concentré sont la flexibilité en termes de choix des matières premières, un rendement élevé en monomères des sucres ainsi que des conditions de températures douces (Wertz et al., 2016).

6.2.2. Hydrolyse enzymatique

Les enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose, appelées communément cellulases. Les cellulases ont d'abord été classées selon leur mode d'action catalytique. Il existe trois types d'activités enzymatiques cellulolytiques complémentaires pour l'hydrolyse totale de la cellulose (Sun et Cheng, 2002):

- les endoglucanases ou 1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolases qui coupent la cellulose aléatoirement au niveau des zones amorphes de la cellulose, générant de nouvelles extrémités de chaînes (Sun et Cheng, 2002; Mussatto et Teixeira, 2010).
- les exoglucanases, comprenant les 1,4-β-glucane glucanohydrolases ou cellodextrinases et les 1,4-β-glucane cellobiohydrolases ou cellobiohydrolases, qui agissent de façon progressive

sur les extrémités libres des chaînes de cellulose, libérant du glucose pour les glucanohydrolases ou du cellobiose pour les cellobiohydrolases (Sun et Cheng, 2002; Mussatto et Teixeira, 2010).

- les β -glucosidases ou β -glucoside glucohydrolases qui hydrolysent les cellodextrines solubles et le cellobiose en glucose (Sun et Cheng, 2002; Mussatto et Teixeira, 2010).

Les cellulases commerciales sont principalement obtenues à partir de cultures aérobiques de *Trichoderma reesei* et *Aspergillus niger* (Sun et Cheng, 2002). L'hémicellulose peut être aussi hydrolysée par l'hémicellulase ou l'acide pour former leur sucres monomères incluant l'arabinose, le galactose, le xylose et le glucose (Mussatto et Teixeira, 2010).

Les systèmes cellulolytiques sont des systèmes multienzymatiques possédant ces trois types d'action, étant ainsi capables de dégrader totalement la cellulose (Figure 9).

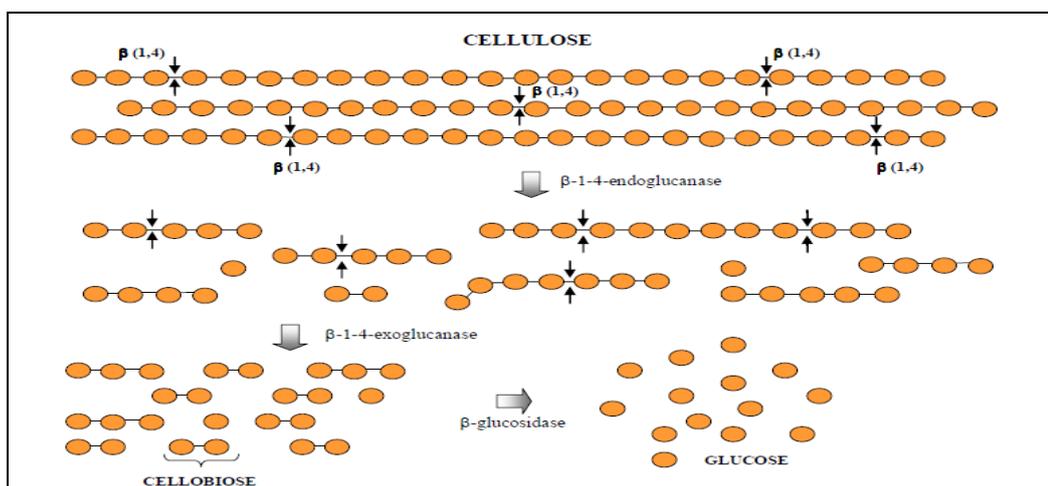


Figure 9. Mode d'action des cellulases sur la cellulose (Mussatto et Teixeira, 2010).

7. Les principales utilisations du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie possède des intérêts multiples et diverses utilisations :

7.1. Intérêt nutritionnel

Les jeunes cladodes sont appelés "Nopalitos" au Mexique où ils sont considérés comme un légume traditionnel depuis des siècles. Elles sont consommées à l'état frais ou

après cuisson en tant que légume vert (Pimienta Barrios, 1993). Elles sont riches en hydrate de carbone, en protéines en vitamine C et en bêta carotène. les cladodes de cactus sont utilisés comme un ingrédient dans une diversité des plats tels que les sauces, les salades, les potages, les ragouts, les boissons et les desserts (Feugang et *al.*, 2006; Jana, 2012).

Les fruits sont connus par leurs teneurs élevés en sucre, minéraux et vitamines. Les fruits sont consommés à l'état frais, séchés, congelés, confits ou transformés en jus concentré, en boisson alcoolisée, en confiture ou en huile alimentaire de la graine (Jana, 2012).

Le Tableau 9 résume les différents produits et coproduits qui peuvent être fabriqués à partir des fruits et cladodes d'*Opuntia ficus indica*.

Tableau 9. Produits et co-produits de fruits et de cladodes de figuier de barbarie (Feugang et *al.*, 2006; Jana, 2012).

Produits		Co-produits
Fruits	Cladodes	Fruits et cladodes
Jus, nectar, pulpe, purée	Vinaigre Lacto-fermenté	Huile de graines
Confiture, gelée	sucreries	Huile de la pulpe de fruit
Fruit	Confiture	Pigments de la peau
Sirop, édulcorant	Farine	Pigments de la pulpe
Bioéthanol, vin, "colonche"	Légume cuit	Fibres diététiques de mucilage de cladodes
Fruit conservé	Ethanol	
Fruit congelé	Peau comestible	
Jus concentré		
Poudre du jus séchée au vaporisateur		

7.2. Production de fourrage pour le bétail

Le cactus est utilisé depuis longtemps dans l'alimentation du bétail des zones arides et sa production dans ces zones est plus rentable que celle de certaines autres espèces fourragères comme le maïs et le sorgho. Il constitue un stock alimentaire pour le bétail dans le cas d'une situation critique de sécheresse (Pimienta Barrios et *al.*, 1993). Un certain nombre de pays: Mexique, USA, Brésil, Pérou, Chili, etc. produisent des quantités importantes de raquettes en tant qu'aliment pour le bétail (Nobel et *al.*, 1987).

7.3. Utilisation du cactus dans l'apiculture

Le cactus est une plante à floraison abondante et son cycle de floraison peut s'étendre de 3 à 6 mois selon la région et la variété. Sa floraison attire les abeilles en masses par leurs grandes fleurs de couleur jaune, leur pollen abondant et leur nectar. Elle assure l'activité des abeilles pour une certaine période et les autres espèces mellifères assurent leur activité pour les autres périodes de l'année (Arba, 2009).

7.4. Production de carmin

Le carmin est un colorant naturel de couleur rouge carmin. Il est actuellement très recherché par les industries alimentaires et cosmétiques pour ses caractères biochimiques (Pimienta-barrios et *al.*, 1993). Il est produit par l'élevage des cochenilles *Dactylopius coccus* et *Dactylopius opuntiae* qui sont des insectes hôtes du cactus (Stintzing et *al.*, 2005). Les cochenilles sont collectées sur le cactus, elles sont séchées à l'air libre pour obtenir un produit brut qui est appelé Grana à partir duquel on peut extraire 10 à 26% de carmin (Pimienta-Barrios, 1993).

7.5. Utilisation médicinale

7.5.1. Utilisations traditionnelles

Opuntia ficus indica est utilisée en médecine populaire au Mexique pour le traitement des brûlures, des blessures, d'œdème et d'indigestion. Il a été rapporté que leur extrait alcoolique possède des activités anti-inflammatoires, hypoglycémiantes et antivirales. En plus, au Mexique les raquettes de cactus sont utilisées traditionnellement pour le traitement de diabète et d'hyperlipidémie, et d'obésité (Saenz, 2000). Le thé aux fleurs d'*Opuntia* est utilisé en Sicile comme remède aux maux des reins (Meyer et McLaughlin, 1981). Des capsules qui

sont fabriquées à partir des fleurs séchées sont utilisées comme régulateurs diurétiques et comme remède au dysfonctionnement de la prostate (Pimienta barrios et *al.*, 1993). Le bouillit des fleurs séchées de la plante est utilisé en pharmacopée traditionnelle au Maroc comme remède aux douleurs gastro-intestinales, aux brûlures et coups de soleil (Ennouri et *al.*, 2005). L'huile essentielle des graines des fruits du cactus sont riches en acides gras polyinsaturés, en stérols et en vitamines, elle est utilisée comme antiride naturel et pour la fabrication des crèmes dermiques antirides (Ennouri et *al.*, 2005).

7.5.2. Effets pharmacologiques

Les données de plusieurs procès humains ou des expériences de rongeurs montrent que les extraits des cladodes et des fruits de cactus sont les préparations les plus testés pour leurs activités biologiques (Tableau 10).

7.5.2.1. Effet Anti-ulcère

Les cladodes d'*Opuntia ficus indica* sont utilisés pour le traitement d'ulcère gastrique en Sicile (Kaur et *al.*, 2012). Un essai de prétraitement sur les rats a révélé une action protectrice contre l'ulcère induit par l'éthanol (Kaur et *al.*, 2012).

7.5.2.2. Effet anti-inflammatoire et analgésique

Une étude a montré que les extraits de fruit et de la raquette, réduisent la lésion gastrique chez le rat (Lee et *al.*, 2002). Différentes études ont été effectuées sur l'action analgésique et anti-inflammatoire de genre *Opuntia* par l'utilisation d'extrait de fruit, des cladodes lyophilisés, ou des phytostérols de fruit et d'extrait des raquettes (Kaur et *al.*, 2012). Le β -Sitostérol est identifié comme le principale anti-inflammatoire active d'extrait de raquette (Park et *al.*, 2001).

7.5.2.3. Effet neuroprotecteur

L'extrait de méthanol des fruits des variétés d'*Opuntia ficus indica* a révélé une importance efficacité dans la lutte contre les dommages neuronaux induits par les radicaux libres dans les cultures corticales de souris (Dok-Go *etal.*, 2003).

Parmi les constituants isolés dans les fruits d'*Opuntia ficus indica*, les trois flavonoïdes (quercétine, dihydroquercétine et quercétine 3-méthyl éther) s'avèrent efficaces dans la protection des cellules corticales de rat (Kaur et *al.*, 2012).

7.5.2.4. Effet anti-cancereux

Des études suggèrent que l'extrait du fruit du cactus, inhibe la prolifération des cellules cancéreuses et supprime la croissance tumorale dans le cas du cancer de l'ovaire chez la souris (Kaur et *al.*, 2012).

7.5.2.5. Effet anti-viral

Une étude intéressante faite par Ahmad et *al.* (1996) a démontré que l'administration de l'extrait de cladode de cactus (*Opuntia streptacantha*) aux souris, aux chevaux, et aux humains inhibe la réplication intracellulaire d'un nombre d'ADN et d'ARN viral comme Herpes recto virus Type 2, Equine herpes virus, Pseudorabies virus, influenza virus, le virus de la maladie respiratoire syncytial et HIV-1. Une inactivation des virus extracellulaires a été également rapportée par les mêmes auteurs.

7.5.2.6. Effet anti-alcool

La figue de barbarie est souvent utilisée pour soulager les symptômes associés à la consommation excessive d'alcool, y compris la bouche sèche et les nausées. Le jus de la figue de barbarie fait également partie de plusieurs formules de prévention de la gueule de bois (Wiese et *al.*, 2004).

7.5.2.7. Effet anti-diabétique

Opuntia spp .peut être efficace dans la réduction de la glycémie (Cicero et *al.*, 2004). En effet, une étude portant sur l'évaluation de l'activité hypoglycémiant d'un extrait épuré des cladodes sur des rats rendus diabétiques, a montré que la glycémie et l'hémoglobine glycosylée ont été réduites aux valeurs normales par un traitement combiné d'insuline et d'extrait des cladodes. Quand l'insuline a été retirée du traitement combiné, l'extrait seul des cladodes a maintenu constante en glycémie chez les rats diabétiques (Feugang et *al.*, 2006).

Une autre étude à montré que la supplémentation des régimes des rats avec l'huile des graines de cactus (25mg/kg) diminue la concentration du glucose dans le sang (Ennouri et *al.*, 2005). Ces observations ont été expliqués par l'induction potentielle de la sécrétion de l'insuline, convertissant le glucose en glycogène (Feugang et *al.*, 2006).

7.5.2.8. Effet anti-hyperlipidémique et anti-hypercholestérolémique

La consommation de l'*Opuntia* empêche l'accumulation excessive des graisses dans le sang en améliorant la microcirculation artérielle et veineux (Stintzing et al., 2005). Galati et al. (2003) ont trouvé que les niveaux de cholestérol, de LDL et de triglycéride dans le plasma des rats étaient fortement réduits après 30 jours d'une administration quotidienne de 1 g/kg des cladodes lyophilisés d'*Opuntia ficus indica*.

7.6. Valorisation biotechnologique

La plante du figuier de barbarie d'*Opuntia ficus indica* peut être valorisée en divers produits tels que la biomasse (Mounir, 2016), les boissons alcooliques (Saenz, 1995), le vinaigre balsamique (Prieto et al., 2009) et le biocarburant etc. (Yang, 2015).

7.6.1. Production de bioéthanol

Les fruits et les cladodes d'*Opuntia ficus indica* sont utilisés pour la production de bioéthanol en utilisant différentes souches du genre *Saccharomyces* (Retamal, 1987).

7.6.2. Production de vin

Le vin est l'un des produits traditionnellement fabriqués au Mexique à partir de figuier de barbarie. Ce vin est ainsi appelé "Colonche", une boisson alcoolique douce bien appréciée pour sa saveur, obtenue par fermentation naturelle du jus de fruit de figuier de barbarie (*O. streptacantha*) (Navarrete-Bolaños et al., 2007).

7.6.3. Bio-floculant

L'étude réalisée par Abid et al. (2009) consiste à utiliser un nouveau floculant naturel biodégradable à base du jus de cactus marocain dans un procédé physico-chimique (coagulation-floculation), pour traiter des rejets liquides chargés en cuivre, en zinc et en matière en suspension, et aussi pour tester l'efficacité de ce jus vis-à-vis des autres produits couramment utilisés dans le traitement des eaux usées.

7.7. Utilisation cosmétique

Le mucilage des raquettes est utilisé dans la fabrication des champoings, des assouplissants des cheveux, des crèmes dermiques et des laits hydratants (Arba, 2009).

Tableau 10. Les effets bioactifs majeurs des préparations de cactus dans les différents modes expérimentales (El-Mostafa et *al.*, 2014).

Activités biologiques	Les sources des produits de cactus	Modes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
Hypolipidémique et hypocholestérolémique	Poudre de cladodes Cladodes (glycoprotéine) Poudre et huile des graines	Rats Souries Rats
Anti-diabétique	Capsule: extrait de cladode et de la peau de fruit Poudre de cactus Extrait aqueux de cladode, de fruit et de mixture Capsule d'extrait de cladode et de fruit	Humain Humain (homme et femme) Rats Homme
Hypoglycémiant	Polysaccharides extraits à partir des cladodes Extrait de poudre des raquettes après séchage	Rats Rats
Anti-inflammatoire	Indicaxanthine à partir des fruits Extrait lyophilisé des cladodes	Ligne des cellules épithéliales intestinales humaine stimulée par cytokine IL-1b Culture chondrocyte humaine stimulée par IL-1 β

Suite du tableau 10.

Activités biologiques	Les sources des produits de cactus	Modes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
Anti-inflammatoire	<p>Indicaxanthine à partir des fruits</p> <p>Méthanol extrait de cladode (cactus stems) (substance active: β-Sitostérol)</p> <p>Extrait méthanolique des fruits de figuier de barbarie (indicaxanthine de betalaïne)</p>	<p>Rat pleurisy obtenue par injection de 0.2 ml de λ-carrageenin dans la cavité pleurale</p> <p>La souris</p> <p>Etude <i>in vitro</i> des interactions entre les bétalaines purifiés, HOCL et myelopéroxydase humain</p>
Anti-inflammatoire et antioxydante	<p>Extrait méthanolique et butanolique de fruit</p>	<p>Des études <i>in vivo</i> chez les gerbilles et <i>in vitro</i> sur des cellules corticales de souris cultivées</p>
Antioxydante	<p>Bétalaïne purifié à partir de la pulpe de fruit de cactus</p> <p>La pulpe de fruit de cactus</p> <p>Betanin extrait de fruit</p> <p>Ethanol extrait de cladode</p> <p>Flavonoïde du jus de fruit de cactus</p> <p>Glycoprotéines (90 kDa) isolé à partir d'<i>Opuntia ficus indica</i> var. saboten MAKINO Fruit de cactus</p>	<p>Veine ombilicale des cellules endothéliale</p> <p>Systèmes chimique et biologique (RBC, LDL humain)</p> <p>Systèmes chimique et biologique (splénocyte de souris)</p> <p>Rats</p> <p>Souris induit par Triton WR-1339</p> <p>Humain sain (10 femmes et 8 hommes) supplémentés avec fruit de cactus ou vitamine C</p>

Suite du tableau 10.

Activités biologiques	Les sources des produits de cactus	Modes <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>
Antimicrobienne	<p>Méthanol extrait de cladode</p> <p>Extraits méthanolique, éthanolique et aqueux de cladode</p> <p>fleurs</p> <p>Extraits aqueux et alcoolique de cladode</p>	<p><i>Campylobacter jejuni</i> and <i>Campylobacter coli</i></p> <p><i>Vibrio cholerae</i></p> <p><i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Proteus mirabilis</i></p>

II. LES BACTERIES LACTIQUES

1. Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques englobent un groupe hétérogène des microorganismes. Elles ont une propriété métabolique commune qui est la production d'acide lactique comme le majeur produit final à partir de fermentation des sucres (Dortu et Thonart, 2009; Quinto et *al.*, 2014).

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, non sporulantes, non mobiles, anaérobies mais aérotolérantes et ne produisent pas de catalase (Vijayakumar et *al.*, 2008; Khalid, 2011). Actuellement, les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Dortu et Thonart, 2009). Elles peuvent avoir des formes de bâtonnet ou de coque (Khalid, 2011; Drouault et Corthier, 2001).

Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant en utilisant des sucres fermentescibles de produire de l'acide lactique. Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent très majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires et produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés (acétate et éthanol en général) (Drouault et Corthier, 2001).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu et Thonart, 2009). Les bactéries lactiques utilisées dans l'alimentation sont considérées comme non pathogènes et se voient attribuer le qualificatif anglo-saxon d'organismes GRAS (Generally Regarded As Safe) (Wessels et *al.*, 2006). Cependant, quelques membres du genre *Streptococcus* et *Enterococcus* ainsi que d'autres bactéries lactiques sont considérées comme pathogènes opportunistes (Drouault et Corthier, 2001).

2. Utilisation des bactéries lactiques

La fermentation lactique des aliments constitue l'une des plus anciennes formes de conservation des aliments. Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des

siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourts et fromages) (Widyastuti et *al.*, 2014). Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, du vin et des ensilages (Tableau 11) (Drouault et Corthier, 2001).

Le principal atout de ces bactéries réside dans leur capacité à acidifier les produits alimentaires (Widyastuti et *al.*, 2014). L'acide lactique, qui est le produit principal du métabolisme fermentaire, joue un rôle majeur dans la conservation des aliments puisqu'il inhibe fortement la croissance des bactéries pathogènes à bas pH (Stiles, 1996). Les bactéries lactiques ont une action déterminante sur les qualités organoleptiques des produits fermentés (texture et arôme par exemple) (Drouault et Corthier, 2001).

Elles sont également impliquées dans de nouveaux types de produits en tant que «probiotiques». Il s'agit des microorganismes vivants qui une fois ingérés, vont conférer un effet physiologique bénéfique à leur hôte animal grâce à leurs propriétés microbiennes (Florou-Paneri et *al.*, 2013).

Les microorganismes considérés comme des probiotiques commerciaux sont principalement du genre *Lactobacillus* avec plus d'une centaine d'espèces reconnues, par exemple: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* (Florou-Paneri et *al.*, 2013).

De nombreuses études sur les probiotiques avec différentes souches de *Lactobacillus* ont été réalisées chez des humains avec des résultats négatifs / non concluants ou positifs. Des résultats positifs ont été obtenus après traitement de diarrhée infectieuse aiguë (Sazawal et *al.*, 2006) ou certaines maladies allergiques telles que la prévention de l'eczéma atopique ou dermatite (Kalliomaki et *al.*, 2003). Ces probiotiques peuvent augmenter l'immunogénicité des vaccins administrés par voie orale tels que rotavirus, polio, choléra et grippe (Quinto et *al.*, 2014).

Les bactéries lactiques ont longtemps été appliquées comme cultures de départ dans des aliments et des boissons fermentés, car ils peuvent améliorer les caractéristiques nutritionnelles, organoleptiques, technologiques et de conservation (Leroy et De Vuyst, 2004). Les bactéries lactiques déclenchent une acidification rapide et adéquate dans les matières premières, à travers la production de divers acides organiques à partir de glucides. L'acide lactique est le plus abondant, suivi de l'acide acétique, tandis que les bactéries lactiques peuvent également produire de l'éthanol, des bactériocines, des composés

aromatiques, des exopolysaccharides et certaines enzymes (De Vuyst et Leroy, 2007). Les bactéries lactiques sont utilisées comme cultures de départ soit dans des produits laitiers ou non laitiers (Tableau 11).

Tableau 11. Bactéries lactiques utilisées comme culture initiale dans les aliments fermentés (Florou-Paneri et al., 2013).

Genres	Application dans les produits laitiers	Application dans les produits non laitiers
<i>Lactobacillus spp</i>	Produits laitiers cultivés fromage, yaourt, kéfir	Saucisse, pain au levain, légumes fermentés
<i>Lactococcus spp</i>	Fromage, babeurre acide, crème, produits laitiers cultivés	-
<i>Leuconostoc spp</i>	Fromage, produits laitiers cultivés, crème acide, babeurre	Légumes fermentés
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Fromage, yogourt	-
<i>Pediococcus</i>	-	Saucisse, légumes fermentés
<i>Tetragenococcus</i>	-	Sauce soja
<i>Oenococcus</i>	-	Vin

Les bactériocines sont des petites protéines synthétisées par voie ribosomique produites par les bactéries lactiques qui inhibe la croissance des bactéries pathogènes dans les aliments. De plus, les bactériocinogènes des bactéries lactiques sont liés et sont utilisés comme cultures initiales dans le traitement des aliments (Quinto et al., 2014).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques peuvent être utilisées comme additif alimentaire. Actuellement, la nisine est commercialement faite sous forme partiellement purifiée et une préparation commercialisée avec le producteur Pediocine PA-1 (AcH) est disponible (Khalid, 2011).

Les humains ne peuvent pas synthétiser la plupart de vitamines, mais il est bien connu que certaines bactéries intestinales comme les bactéries lactiques peuvent produire des

vitamines (acide folique, la vitamine B12 ou cobalamine, la vitamine K2, la riboflavine et la thiamine) (LeBlanc et *al.*, 2011).

Les bactéries possèdent une vaste collection d'enzymes dont beaucoup ont le potentiel d'influencer la composition, le traitement, les propriétés organoleptiques et la qualité des aliments pour les humains et les animaux (Florou-Paneri et *al.*, 2013). Les bactéries lactiques libèrent diverses enzymes dans le tractus gastro-intestinal et exercent des effets synergiques sur la digestion et soulagent les symptômes de malabsorption intestinale (Naidu et *al.*, 1999). En d'autres cas, ces organismes peuvent servir de source pour la préparation d'extraits d'enzymes qui sont capable de fonctionner sous les conditions environnementales de la fermentation (Tamang et *al.*, 2011).

Un certain nombre de bactéries lactiques peuvent produire une variété de polymères de sucres à longue chaîne, appelée exopolysaccharides (EPS) qui sont principalement utilisés pour la production de produits laitiers fermentés (Florou-Paneri et *al.*, 2013).

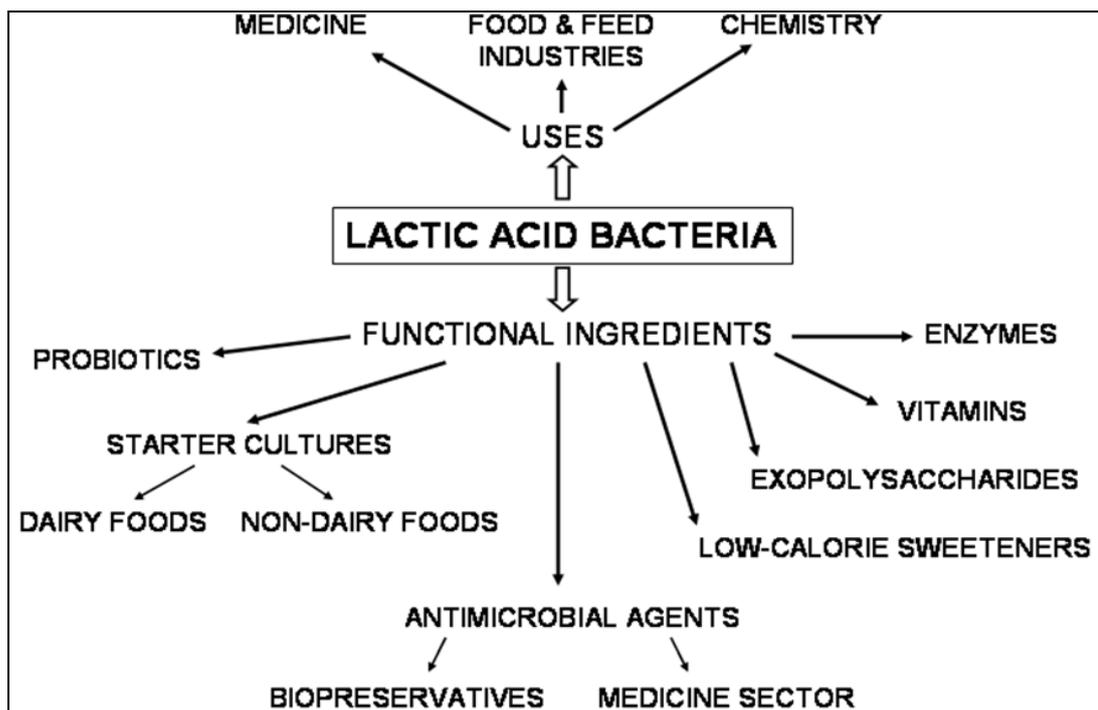


Figure 10. Usages et ingrédients fonctionnels des bactéries lactiques (Florou-Paneri et al., 2013).

Tableau 12. Exemples de bactéries lactiques utilisées dans la fermentation des aliments (Drouault et Corthier, 2001).

Aliments/produits	Ingrédients	Bactéries lactiques
Produits laitiers		
Fromages	Lait de vache, chèvre ou brebis	Lactocoques, lactobacilles
Yaourt	Lait de vache	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>Thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
Lait fermenté	Lait de vache	<i>Lb. acidophilus</i>
Kéfir	Lait de vache, de jument ou de chèvre	<i>Lb. kefir</i>
Produits carnés et de la pêche		
Saucisse sèche	Porc, bœuf	Pediocoques, <i>Lb. Plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i>

Suite du Tableau 12.

Aliments/produits	Ingrédients	Bactéries lactiques
Produits carnés et de la pêche		
Saucisse semi-sèche	Porc	Pediocoques
Izushi	Poisson, riz, légumes	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Produit végétaux		
Ogi (Nigeria)	Maïs	<i>Lb. plantarum</i> , <i>L. lactis</i>
Olives	Olives vertes	Pédiocoques, <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>
Pickles	Concombres	Pédiocoques, <i>Lb. plantarum</i>
Choucroute	Chou	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Sauce soja	Soja	<i>Lb. bulgaricus</i> subsp. <i>delbruekii</i>
Vin	Raisin	<i>Leu. oens</i>
Sake	Riz	<i>Lb. sake</i> , <i>Lb. homohiochi</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>
Pain		
Idli	Farines de riz et de haricots	<i>Leu. mesenteroides</i>
San Francisco sourdough	Farine de blé	<i>Lb. sanfrancisco</i>

3. Classification phylogénétique

Les bases générales de classification des bactéries lactiques sont reliées aux travaux d'Orla-Jensen (1924). La classification des genres de bactéries lactiques était basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance sous certaines températures et le mode d'utilisation du sucre. Même si la taxonomie a été révisée depuis lors, les caractères utilisés par Orla-Jensen sont encore très importants dans la classification actuelle des bactéries lactiques (Khalid, 2011).

Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries ayant des similitudes morphologiques, métaboliques et physiologiques, et elles sont étroitement apparentées phylogénétiquement (Khalid, 2011).

L'accord commun est qu'il existe un groupe central composé de quatre genres; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. Des révisions taxonomiques récentes ont proposé plusieurs nouveaux genres et le groupe restant comprend maintenant ce qui suit: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella*. Les lactobacilles, les carnobactéries et certaines *Weissella* sont des bâtonnets tandis que les genres restants sont des coques (Jin et al., 2009).

- Les lactocoques

Lactococcus, originaire du genre streptocoque et reclassifié dans le genre *Lactococcus* en 1985. Il s'agit donc de bactéries en forme de coques, regroupées ou non en chaînettes de longueurs variables. Elles présentent un métabolisme homolactique, aucune activité α -hémolytique, et sont mésophiles puisque leur température optimale de croissance est proche de 30°C. Le genre *Lactococcus* inclut différentes espèces, *garviae*, *lactis*, *piscium*, *plantarum* et *raffinolactis*. L'espèce *lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces, *cremoris*, *hordniae* et *lactis* (Song et al., 2017).

Les différentes sous-espèces de *Lactococcus lactis* (Figure 11) peuvent être différenciées entre autre par leur résistance aux stress (Sanders et al., 1999). Ainsi, la sous-espèce *lactis* est plus robuste que *cremoris* puisqu'elle est capable de croître à 40°C, ou en présence de 4% de NaCl (Sanders et al., 1999).



Figure 11. *Lactococcus lactis* (<http://zenkefir.blogspot.com/2011/03/so-what-is-milk-kefir-part-2.html>).

- Les lactobacilles

Lactobacillus représente un groupe très diversifié des bactéries à Gram-positif, microaérophile apparaissent microscopiquement comme des bacilles longs fins souvent regroupés en chaînes (parfois incurvés) (Figure 12), ou des coccobacilles dont la forme est proche à celle des corynébactéries. *Lactobacillus spp* sont soit homo- ou hétérofermentaires selon leur métabolisme d'hexose (Fugelsang et Edward, 2007).

Les membres du genre *Lactobacillus* ne forment pas des spores, catalase négatif (même si certaines souches sont capables de produire de pseudocatalase), ils possèdent 59,2% de bases GC dans leur génome (Salvetti et al., 2012).

Les lactobacilles sont généralement aérotolestants ou anaérobies, aciduriques ou acidophiliques. En général, ils ne synthétisent pas de porphyrinoïdes et sont dépourvus d'activités hémi-dépendantes (Hammes et Vogel, 1995).

Leur température de croissance varie de 2 à 53°C, ils peuvent croître dans une gamme de pH comprise entre 3 et 8. Leur température de croissance optimale et leur pH optimal sont généralement de 30 à 40°C et 5,5 - 6,2, respectivement (Salvetti et al., 2012). Aujourd'hui, le genre *Lactobacillus* contient 88 espèces et 15 sous-espèces selon une liste récente (Tableau 13).

Tableau 13. Espèces *Lactobacillus* (Coeuret et al., 2003).

<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
*<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus animalis</i>	*<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus agilis</i>	<i>Lactobacillus arizonensis</i>	<i>Lactobacillus catenaformis</i>
<i>Lactobacillus aligidus</i>	<i>Lactobacillus aviarius</i>	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>ssp. araffinosus</i>	<i>Lactobacillus coleohominis</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus aviarius ssp. aviarius</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>
	<i>Lactobacillus bifermentans</i>	<i>Lactobacillus coryniformis ssp. Coryniformis</i>

Suite du Tableau 13.

<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>ssp. torquens</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>parabuchneri</i>
* <i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>heterohiochii</i>	* <i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>ssp. Paracasei</i>
<i>ssp. Curvatus</i>	<i>Lactobacillus homohiochii</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus curvatus ssp.</i>	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>ssp. tolerans</i>
<i>melibiosus</i>	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	<i>Lactobacillus parakefiri</i>
<i>Lactobacillus cypricasei</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	* <i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>paralimentarius</i>
<i>ssp. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
* <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>kefiranofaciens</i>	<i>paraplantarum</i>
<i>ssp. delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>	<i>Lactobacillus perolens</i>
<i>ssp. lactis</i>	<i>Lactobacillus kimchii</i>	* <i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus durianis</i>	<i>Lactobacillus leichmannii</i>	<i>Lactobacillus psittaci</i>
<i>Lactobacillus equi</i>	<i>Lactobacillus lindneri</i>	* <i>Lactobacillus reuteri</i>
* <i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus</i>	* <i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>malefermentans</i>	<i>Lactobacillus rogosae</i>
<i>ferintoshensis</i>	<i>Lactobacillus mali</i>	<i>Lactobacillus ruminis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sakei ssp.</i>
<i>Lactobacillus fornicalis</i>	<i>maltaromicus</i>	<i>carnosus</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sakei ssp.</i>
<i>Lactobacillus frumenti</i>	<i>manihotivorans</i>	<i>sakei</i>
<i>Lactobacillus fuchuensis</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus murinus</i>	<i>ssp. salicinius</i>
* <i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus graminis</i>	<i>Lactobacillus oris</i>	<i>ssp. salivarius</i>
<i>Lactobacillus hamsteri</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pantheris</i>	<i>Lactobacillus sharpeae</i>

Suite du Tableau 13.

<i>Lactobacillus suebicus</i>	<i>vaccinostercus</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
<i>Lactobacillus trichodes</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus vitulinus</i>	

En gras: *Lactobacillus* utilisé dans les produits laitiers; Avec un *: *Lactobacillus* utilisé dans un produit probiotique.

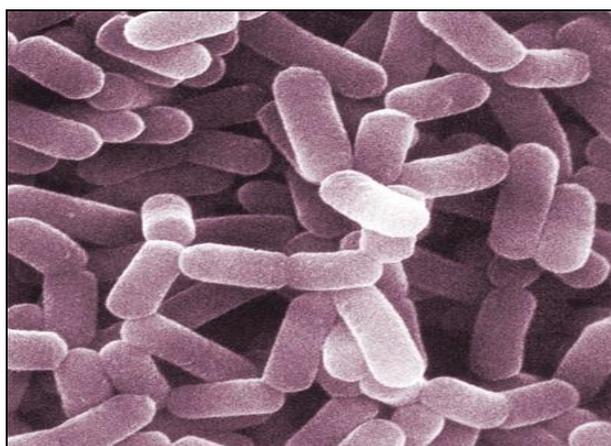


Figure 12. *Lactobacillus casei* (<https://www.flickr.com/photos/ajc1/8344600413>).

4. Voies fermentaires générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont divisées en deux groupes principaux d'espèces homo- ou hétérofermentaires selon la nature et la concentration des produits terminaux issus de la fermentation du glucose. Les bactéries lactiques homolactiques utilisent la voie de la glycolyse Embden-Meyerhoff-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphate).

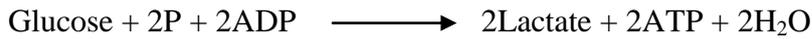
4.1. Voie homofermentaire

Les microorganismes qui utilisent cette voie pour la fermentation des sucres s'appellent homofermentaires obligatoires incluant *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus salivarius* (Mayo et al., 2010).

Les bactéries lactiques homofermentaires (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* et quelques espèces de *Lactobacillus*) (Lahtinen, 2012) fermentent les sucres

par la voie de la glycolyse (Embden-Meyerhoff-Parnas) (EMP). Les enzymes clefs dans cette voie sont le glucose 6 P-isomerase, 6-phosphofructokinase et le fructose biphosphate aldolase (Eiteman et Ramalingam, 2015).

Dans cette voie le glucose est converti en acide lactique (deux molécules d'acide lactique et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommé) (Figure 13) (Eiteman et Ramalingam, 2015):



La première étape de la glycolyse est la phosphorylation de glucose en fructose-1,6-diphosphate (FDP) qui se divise en dihydroxyacétonphosphate (DHAP) et glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP), le DHAP formé est également converti en GAP. Le GAP est converti par la suite en pyruvate via une voie qui comprend deux étapes de phosphorylation au niveau du substrat (Aarnikunnas, 2006). Finalement, le pyruvate est réduit en acide lactique par le lactate déshydrogénase (LDH) en utilisant le NADH comme facteur. Dans la glycolyse le cofacteur NADH réduit est réoxydé en NAD⁺ est donc un solde redox est obtenue (Axelsson, 2004; Aarnikunnas, 2006).

Des sucres autres que le glucose peuvent également être fermentés via cette voie: monosaccharides, disaccharides et hexitols.

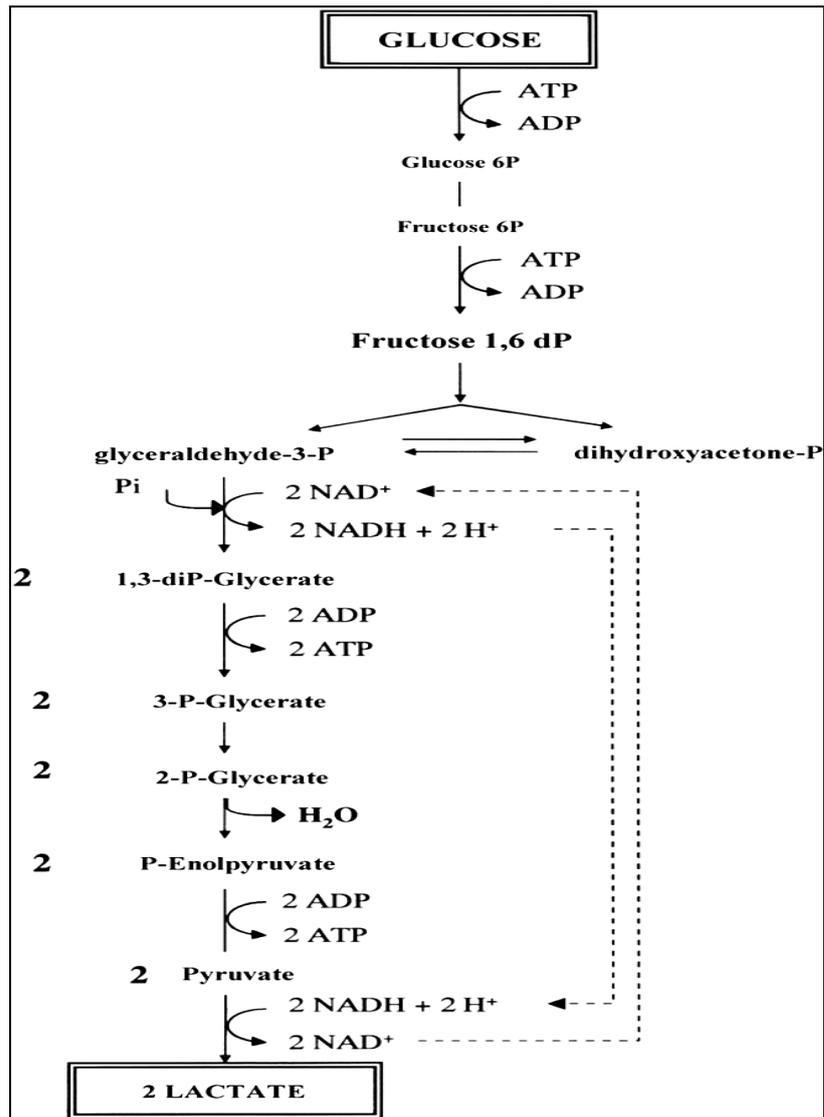


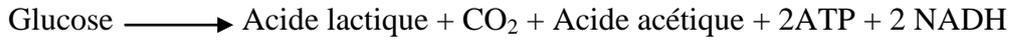
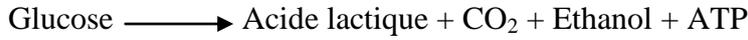
Figure 13. La voie homofermentaire de la fermentation du glucose chez les bactéries lactiques (Martinez et *al.*, 2013).

4.2. Voie hétérofermentaire

Les bactéries hétérofermentatives comme *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et certaines espèces *Lactobacillus* fermentent généralement les sucres par la voie de phosphocétolase (PPC).

Chez ces bactéries la fermentation du glucose produit, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ (Figure 14) (Martinez et *al.*, 2013). La première étape de la dégradation du glucose appelée la voie de pentose phosphate conduit à la production de glycéraldéhyde 3-phosphate, du acétyl-phosphate et du CO₂ (Martinez et *al.*, 2013). Le

glyceraldehyde 3-phosphate entre dans la voie de la glycolyse par lequel est transformé en acide lactique tandis que l'acétyl-phosphate est converti en acide acétique et/ou éthanol selon les équations suivantes (Martinez et al., 2013):



Le métabolisme hétérofermentaire est deux fois moins énergétique que le métabolisme homofermentaire puisqu'une mole de glucose conduit à la production d'une mole de lactate, d'éthanol, de CO₂ et d'un seul ATP (Aarnikunnas, 2006).

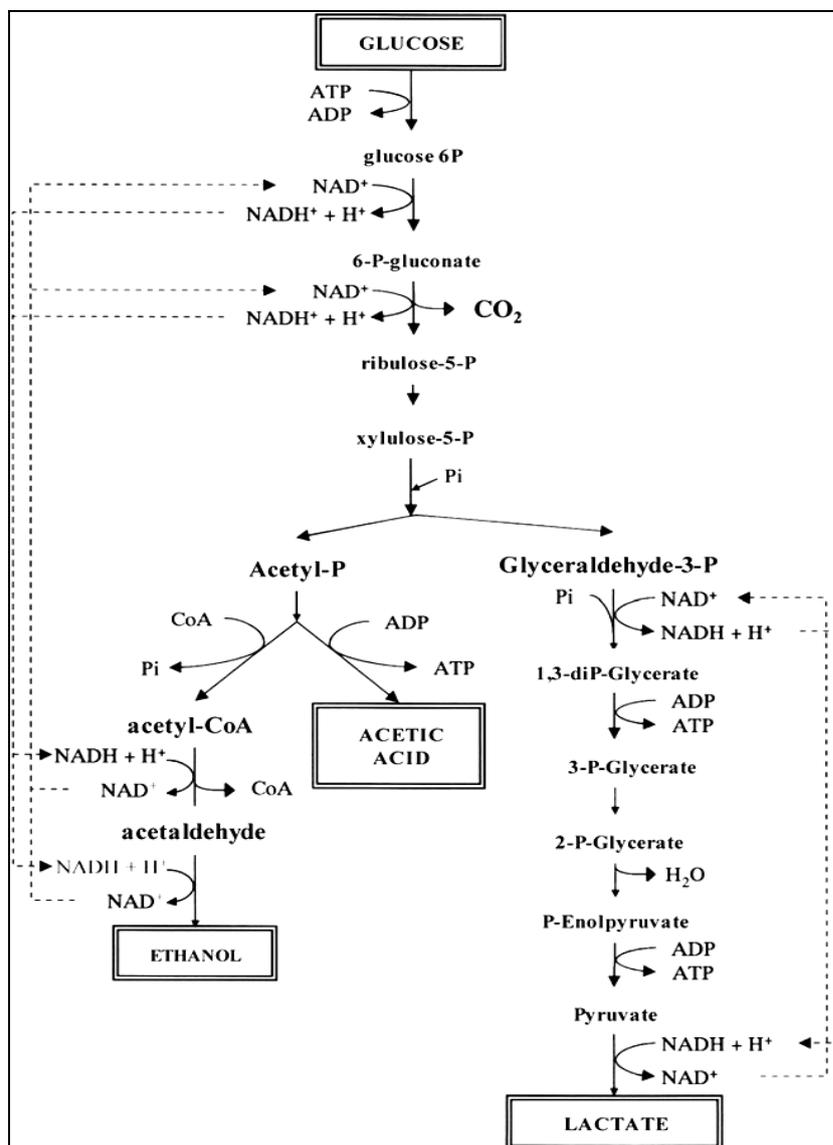


Figure 14. La voie hétérofermentaire de la fermentation du glucose chez les bactéries lactiques (Martinez et al., 2013).

5. Métabolisme carboné chez les bactéries lactiques

5.1. Transport des sucres

L'évènement initial du métabolisme des sucres est leur transport à travers la membrane cytoplasmique. L'entrée des sucres dans la cellule nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Chez les bactéries, trois types de systèmes existent, primaire, secondaire et groupe de translocation, mais deux sont particulièrement importants chez *Lactococcus lactis*: le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS) et le système perméase (Poolman, 2002).

5.1.1. Le système perméase

Le système perméase énergie-dépendant (Figure 15), fait pénétrer les sucres sous forme libre (Konings *et al.*, 1994). Une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie des protons générant ainsi un potentiel électrochimique de protons, appelé force protomotrice, à travers la membrane. Dans ce cas, le transport du sucre est couplé au mouvement de protons le long du gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il peut s'effectuer contre le gradient de concentration du sucre (Figure 15). Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat carboné est phosphorylé grâce à une kinase ATP-dépendante puis va être dégradé (Axelsson, 2004, Neves *et al.*, 2005).

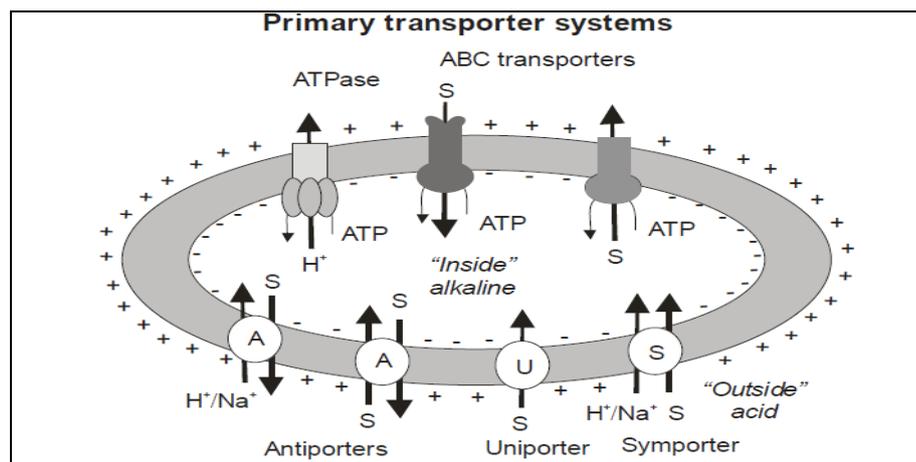


Figure 15. Différents types de systèmes de transport des sucres (Aarnikunnas, 2006).

5.1.2. Le système PTS

Le système PTS (phosphotransférase PEP-dépendant) est impliqué dans le transport et la phosphorylation des sucres chez les bactéries (Aarnikunnas, 2006) (Figure 16). De point de vue bioénergétique le système PTS est le plus favorable que le système perméase. En effet, il couple l'entrée et la phosphorylation du sucre avec la dépense d'une molécule de PEP tandis que l'accumulation du sucre par un système non-PTS nécessite la dépense de plus d'un équivalent ATP car le transport et la phosphorylation ATP-dépendante sont physiquement séparés.

Différentes protéines sont impliquées dans ce système, les deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPr, sont communes à tous les systèmes, alors que les complexes « enzyme II » (EIIs) sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport (Postma *et al.*, 1993).

Le métabolisme du lactose, de glucose et de galactose est de pertinence spéciale pour l'industrie laitière. Selon la littérature, le système PTS impliqué dans le transport du glucose chez *Lactococcus lactis* est en fait un PTS mannose (PTS_{man}) qui présente une forte affinité pour le glucose, le mannose, mais aussi le fructose et la glucosamine. Le glucose est transporté et phosphorylé simultanément par le EIIA en glucose 6-phosphate, le point d'entrée dans la voie de la glycolyse. Le deuxième système PTS est le PTS glucose qui exhibe la spécificité au glucose et au méthyle glucoside décrit pour quelques souches. Alternativement, le glucose peut être transporté via une perméase et phosphorylé plus tard par une glucokinase ATP dépendante (Neves, 2005).

Les *Lactococci* sont également capables de métaboliser le lactose. Son entrée dans la cellule s'effectue via un PTS spécifique de lactose pour donner le lactose 6-phosphate ou bien par une perméase. Le lactose 6-phosphate est hydrolysé par la suite par la phospho- β -galactosidase pour produire le galactose 6-phosphate et le glucose. Après la phosphorylation via la glucokinase le glucose peut entrer la glycolyse tandis que le galactose 6-phosphate est ensuite métabolisé en intermédiaires de la glycolyse DHAP et en glyceraldehyde 3-phosphate par trois enzymes de la voie de tagatose 6-phosphate (Neves, 2005).

Le saccharose chez quelques souches de *Lactococcus lactis* entre dans la cellule par un PTS spécifique du saccharose pour former le saccharose 6-phosphate qui est hydrolysé par la

suite en glucose 6-phosphate et en fructose. Pour entrer dans la voie de la glycolyse le fructose est phosphorylé par une fructokinase ATP dépendante (Neves, 2005).

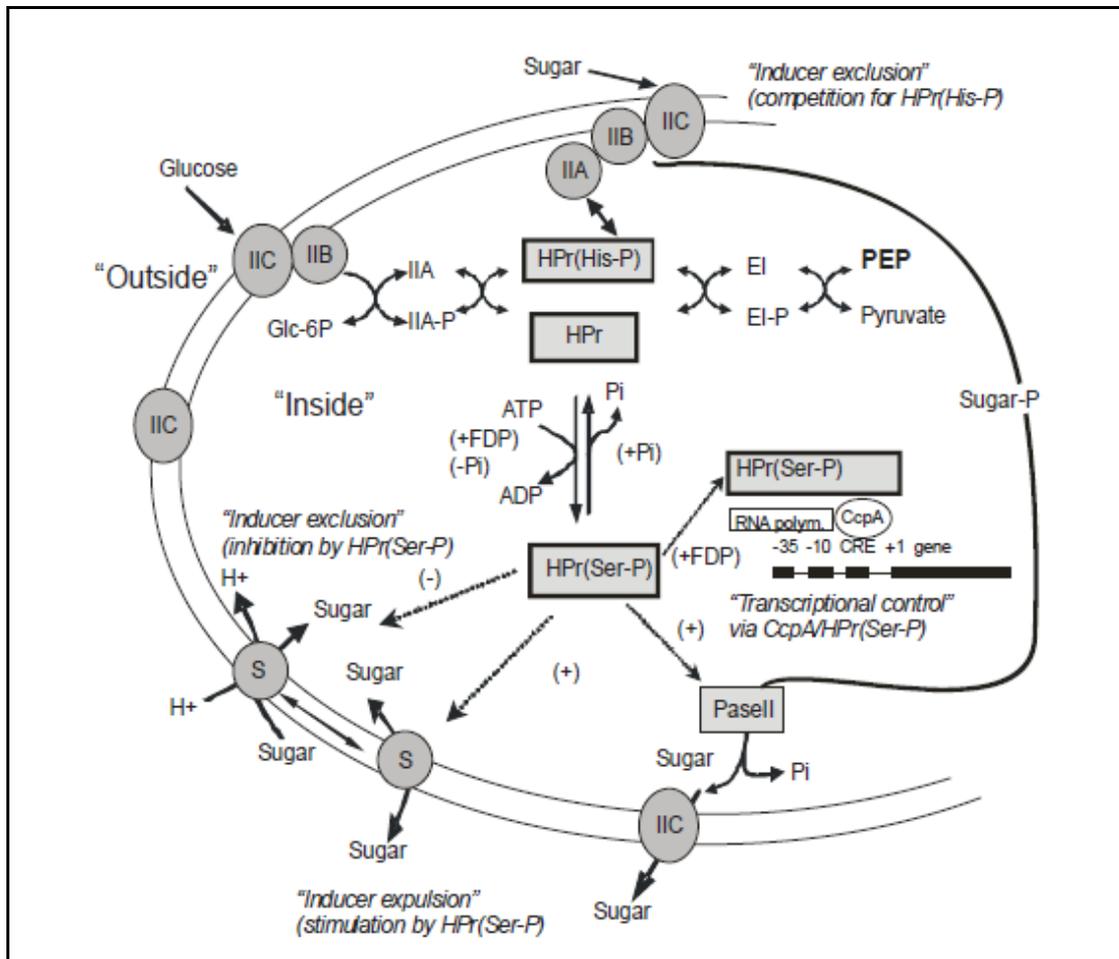


Figure 16. Système PTS (Aarnikunnas, 2006).

6. Facteurs affectants la fermentation lactique

6.1. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

6.1.1. Besoins en vitamines

Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser certaines vitamines indispensables à leur croissance. Celles-ci doivent être fournies par le milieu de culture. Elles jouent un rôle de coenzyme dans le métabolisme cellulaire. Généralement, les besoins des bactéries lactiques portent souvent sur les vitamines du groupe B (Payot et *al*, 1998).

6.1.2. Besoins en acides aminés

Les bactéries lactiques sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés et doivent par conséquent, faire appel à des sources exogènes pour assurer le métabolisme. De nombreux auteurs (Nancib et *al.*, 2001) constatent que l'ajout d'extrait de levure dans un milieu de culture, améliore la croissance et la production d'acide lactique chez les lactobacilles. Il apparaît que l'extrait de levure apporte à la fois des nutriments azotés et des facteurs de croissance. La source azotée peut être disponible sous forme d'acides aminés, de peptides ou de composés inorganiques. Elle peut être ajoutée au milieu de culture comme la peptone, l'extrait de levure, l'urée et le sulfate d'ammonium. Les besoins en acides aminés sont cependant variables d'une souche à une autre.

6.1.3. Besoins en éléments minéraux

Les éléments minéraux jouent un rôle essentiel dans la croissance des bactéries lactiques et précisément dans les activités enzymatiques bactériennes. Ils ont une fonction de cofacteur pour de nombreuses enzymes.

Les exigences en éléments minéraux peuvent varier d'une espèce à une autre. Il a été montré que les ions Mn^{2+} , Mg^{2+} ainsi que le Fe^{2+} ont un effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique chez les lactobacilles. Tandis que Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} interviennent dans la nutrition des lactocoques (Zhang et *al.*, 2009).

6.2. Influence du pH

Puisque les bactéries lactiques se développent préférentiellement au pH entre 5 et 7, l'acidification du milieu associée à la production d'acide lactique inhibe la fermentation (Roberto et *al.*, 2007). Pour minimiser cette occurrence, le pH peut être maintenu environ 6 par l'addition de carbonate de calcium au début des fermentations discontinues, de sorte que l'acide lactique peut être neutralisé en même temps qu'il est formé. Hetényi et *al.* (2011) ont testé cinq différents composés pour contrôler le pH, à savoir l'hydroxyde d'ammonium, l'hydroxyde de sodium, la diméthylamine, la triméthylamine et le carbonate de calcium. Le triméthylamine s'est avéré être le meilleur agent neutralisant, même si l'utilisation d'hydroxyde d'ammonium serait également souhaitable de point de vue technologique. Peeva et Peev (1997) ont utilisé une méthode combinée pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* où conformément à la fermentation enzymatique, l'hydrolyse de l'urée a

libéré l'hydroxyde d'ammonium nécessaire pour neutraliser l'acide lactique. L'utilisation des souches mutées capables de croître à des pH bas peut être une stratégie alternative pour submerger l'inhibition par le produit acide. En effet, l'utilisation des souches capables de tolérer les conditions acides aiderait à réduire l'ajout d'agents tampons comme le carbonate de calcium réduisant ainsi le coût, les problèmes de la contamination et la récupération de l'acide lactique libre à partir de bouillon de fermentation est plus facile (John et Nampoothiri, 2008).

6.3. Inhibition par le substrat

L'inhibition par le substrat semble dépendre du microorganisme et de la source de carbone. Une augmentation de la concentration initiale du glucose fait retarder la croissance de *Lactobacillus delbrueckii* et de *Lactobacillus bulgaricus* en réduisant la productivité spécifique (Gonçalves et al., 1991) et le rendement de production d'acide lactique (Burgos-Rubio et al., 2000). Une telle inhibition n'a pas été observée en utilisant *Lactobacillus casei* sur saccharose jusqu'à 100 g/l (Buyukkileci et Harsa, 2004), *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus pentosus* sur xylose jusqu'à 20 g/l (Garde et al., 2002) et *Lactobacillus helveticus* sur lactose jusqu'à 110 g/l (Schepers et al., 2002). Pour minimiser cette inhibition, le substrat peut être ajouté au milieu de fermentation selon le procédé fed-batch (Roukas et Kotzekidou, 1998; Bai et al., 2003).

6.4. Inhibition par le produit

L'acide lactique exerce un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire au cours des fermentations (Madzingaidzo et al., 2002). Loubiere et al., (1997) suggèrent que l'inhibition de la croissance est probablement dû à l'augmentation de la pression osmotique et aussi à certains sous-produits de fermentation tels que l'acide formique, l'acide acétique ou bien le formiate de sodium qui peuvent exercer des effets inhibiteurs (Lin et al., 2008). Pour atténuer l'effet de l'inhibition, diverses stratégies ont été utilisées, parmi lesquelles l'utilisation de technologies de fermentation capable de retirer l'acide lactique au fur et à mesure de sa production (Kaufman et al., 1996; Moldes et al., 2001). La neutralisation d'acide lactique pour donner une forme dissociée qui a un effet inhibiteur moindre (Milcent et Carrere, 2001; Madzingaidzo et al., 2002); l'adaptation du microorganisme et/ou l'utilisation de cultures mixtes (Cui et al., 2011).

III. L'ACIDE LACTIQUE

1. Généralité

L'acide lactique (ou acide α -hydroxypropanoïque), est l'acide carboxylique le plus largement produit dans la nature, il est le principale composant de tous les produits laitiers acidifiés. Il a été isolé pour la première fois en 1780 par le chimiste suédois, Carl Wilhelm Scheele et sa production industrielle a commencé aux Etats-Unis (Bayitse, 2015; Martinez et *al.*, 2013; Narayanan, 2004). De nos jours, 90% de la production d'acide lactique est fourni par fermentation microbienne (Komesu et *al.*, 2017).

L'acide lactique est un acide organique naturel principalement utilisé dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Sirisansaneeyakul et *al.*, 2007; Zhang et *al.*, 2007). Il est classé comme GRAS (Generally Recognize As Safe) pour son utilisation comme additif alimentaire par la FDA (Food and Drug Administration) (Martinez et *al.*, 2013). La production biotechnologique d'acide lactique s'avère intéressante pour la production de poly lactique acide (PLA) un polymère biodégradable qui a été utilisé comme une alternative au plastic biodégradable dérivé de matières pétrochimiques (Bayitse, 2015).

Le marché mondial de l'acide lactique en 2007 a été estimé de 130 000 à 150 000 tonnes par an, avec un prix commercial d'acide lactique de catégorie alimentaire s'étend entre 1,38 US\$/kg (50% de pureté) et 1,54 US\$/kg (88% de pureté) (John et *al.*, 2007). En 2013, la demande globale mondiale d'acide lactique a été estimé de 714,2 kilo tonnes et selon les prévisions, sa production peut augmenter de 15,5% par an pour atteindre 1960,1 kilo tonnes en 2020 (Komesu et *al.*, 2017).

2. Propriétés physico-chimiques de l'acide lactique

L'acide lactique est un acide organique à trois carbones: un atome de carbone terminal faisant partie d'un groupe carboxyle, l'autre atome de carbone terminal faisant partie d'un groupe hydrocarboné ou méthyle et un atome de carbone central ayant un groupe de carbone de l'alcool.

L'acide lactique existe sous deux formes isométriques optiquement actives:

L'une est connue sous le nom d'acide (L)-lactique ou (s)-lactique et l'autre est connue sous le nom de (D)-lactique ou l'acide (r)-lactique (Figure 17). L'acide (L)-lactique est l'isomère important biologiquement (Ren, 2010).

Le comportement chimique de l'acide lactique est déterminé par ses propriétés physico-chimiques, parmi lesquelles a) le caractère acide dans le milieu aqueux; b) la réactivité bi-fonctionnelle associée à la présence de groupe carboxyle et de groupe hydroxyle ce qui lui donne une grande réaction polyvalente et c) l'activité optique asymétrique de C2 (Martinez et *al.*, 2013). Il est miscible dans l'eau ou dans l'éthanol et il est hygroscopique. Il est très peu volatil et incolore.

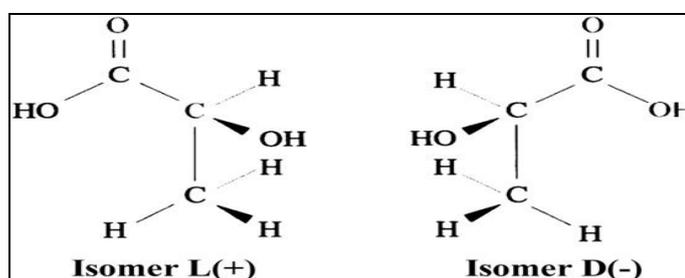


Figure 17. Structure tridimensionnelle des deux formes isomériques de l'acide lactique (Martinez et *al.*, 2013).

3. Production de l'acide lactique

L'acide lactique peut être produit soit par synthèse chimique soit par fermentation microbienne (Figure 18).

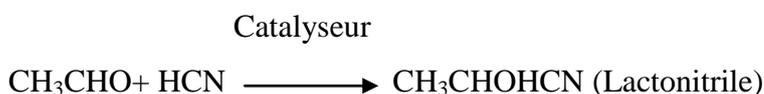
3.1. Voie chimique

Le processus commercial de la synthèse chimique d'acide lactique est basé sur le lactonitrile (Narayanan et *al.*, 2004). Du cyanure d'hydrogène est ajouté à de l'acétaldéhyde en présence d'une base pour produire du lactonitrile (Narayanan et *al.*, 2004; Ghaffar *etal.*, 2014). Le lactonitrile est récupéré et purifié par distillation. Puis hydrolysé par l'acide chlorhydrique ou bien par l'acide sulfurique pour produire l'acide lactique. L'acide lactique est ensuite estérifié avec du méthanol pour produire du lactate diméthyle, que l'on purifie par distillation. Le lactate diméthyle est ré-hydrolysé par de l'eau dans une réaction acide catalytique pour produire de l'acide lactique à nouveau ainsi que du méthanol (Ghaffar *etal.*, 2014). Cette synthèse chimique produit un mélange racémique d'acide lactique D et L

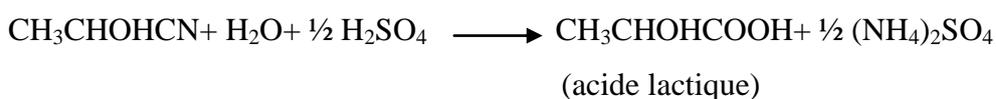
(Narayanan, et *al.*, 2004; Dey et Pal, 2012). La purification de l'acide lactique est réalisée par estérification avec du méthanol.

Ce processus est représenté par les réactions suivantes (Boontawan et *al.*,2011):

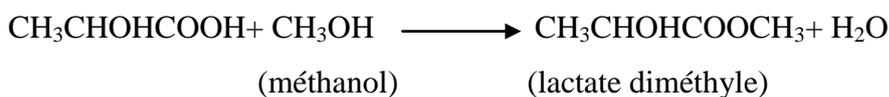
a) Addition de cyanure d'hydrogène:



b) Hydrolyse par H_2SO_4



c) Estérification



d) Hydrolyse par H_2O



La synthèse chimique d'acide lactique est moins utilisée à cause de ses effets néfastes sur l'environnement (Neerayman et *al.*, 2004).

3.2. Voie fermentaire

La synthèse de l'acide lactique par voie fermentaire permet de produire le stéréoisomère d'acide lactique désiré grâce à l'utilisation de bactéries lactiques homofermentaires. Les microorganismes généralement utilisés pour la production d'acide lactique sont des bactéries homofermentaires ne produisant qu'un seul isomère optique D(-) ou L(+) de l'acide lactique. Les qualités recherchées chez ces bactéries sont la capacité de fermentation, la faible production de co-produits, la résistance à l'acide lactique et des besoins nutritionnels aussi faibles que possible. Les souches pouvant se développer à faible pH et haute température sont particulièrement intéressantes, car dans ces conditions, les risques de contaminations sont réduites. La mise en œuvre de ces microorganismes en fermenteur est souvent en mode discontinu ou continu.

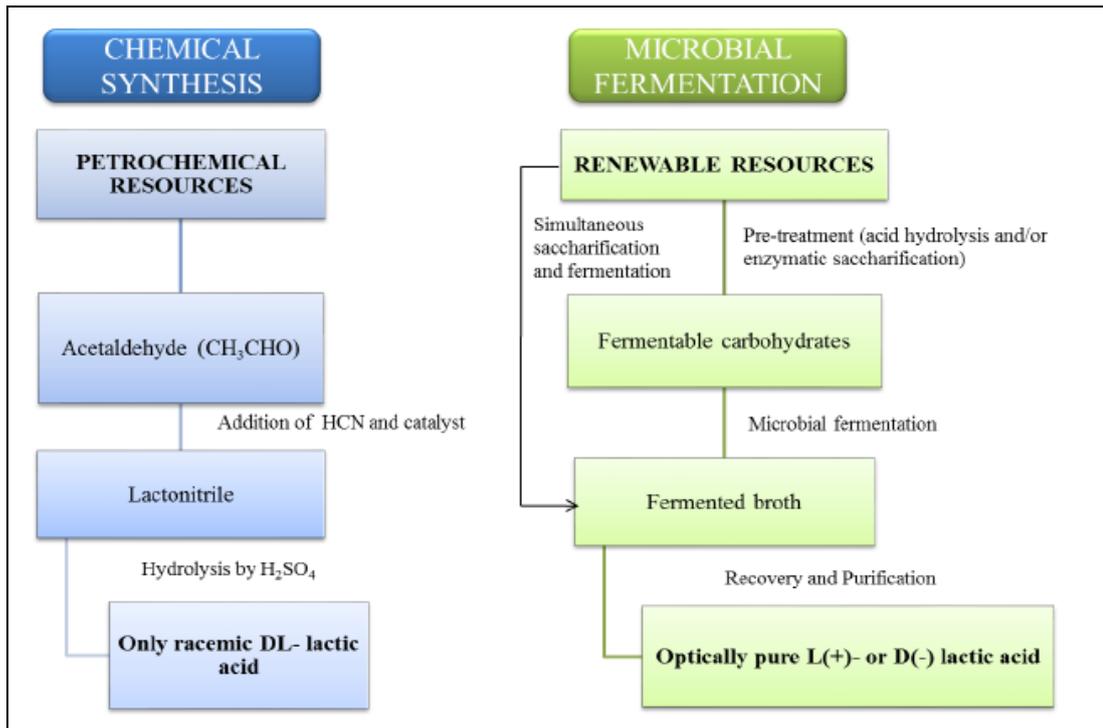


Figure 18. Représentation schématique de deux processus de production d'acide lactique (Komesu et *al.*, 2017).

4. Microorganismes producteurs d'acide lactique

L'acide lactique peut être produit par divers microorganismes tels que les bactéries, les champignons, et les levures.

4.1. Les bactéries

4.1.1. Les lactobacilles

Les lactobacilles sont les microorganismes les plus fréquemment utilisées pour la production d'acide lactique. Les propriétés technologiques apportées par ces bactéries sont nombreuses parmi elles, l'activité acidifiante, mais ont par contre des exigences nutritionnelles plus importantes (Ren, 2010).

Les souches étudiées pour la production d'acide lactique sont généralement issus du lait, homofermentaires ou hétérofermentaires facultatives, mésophiles et aérotolérantes. Les souches les plus couramment rencontrées : *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus delbrueckii* excellents producteurs, mais les lactobacilles thermophiles sont rares et la limite de croissance se situe vers 45°C.

4.1.2. Les bacilles

Le groupe des bacilles thermophiles est très hétérogène, peu de souches sont capables de produire l'acide lactique en forte concentration (supérieur à 50 g/l), mais leur caractère thermophile est très attracteur pour une utilisation industrielle : limitation de problèmes de contamination et des coûts de refroidissement; c'est le cas pour *Bacillus coagulans* (Payot et al., 1999).

4.1.3. Les lactocoques

Originaire du genre *Streptococcus* et re-classifié dans le genre *Lactococcus* en 1985, *Lactococcus lactis* est divisé en trois sous-espèces à savoir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, et *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* (Song et al., 2017). *Lactococcus lactis* a été utilisée pendant des siècles dans la fermentation des aliments spécialement le fromage, le yaourt, la choucroute. En plus de donner du goût, *Lactococcus lactis* devient une bactérie lactique productrice d'acide lactique (Song et al., 2017).

4.1.4. Les corynébactéries

Les Corynébactéries sont des bactéries à Gram positif, naturellement présentes dans le sol appartenant à l'ordre des Actinomycétales (Eggeling et Bott, 2005). Ils sont non sporulants, non mobiles, et non acido-résistants (Inui et al., 2004). Les Corynébactéries sont des bacilles effilés, courts, souvent incurvés et que l'on retrouve en fuseaux plus ou moins longs rangés en palissades ou en lettres V (Figure 19). Ils sont catalase positif et chimioorganotrophes sont employées dans la production industrielle des acides aminés tels que le glutamate, la lysine, l'isoleucine et les acides organiques tels que le lactate et le succinate (Inui et al., 2004; Truc Khuat et al., 2014).

Actuellement, la production du lactate chez *Corynebacterium glutamicum* a été observée dans les conditions de limitation de l'oxygène, et aussi dans des conditions aérobies: soit au début de la phase stationnaire de croissance, soit au cours de la phase exponentielle de croissance lors d'une limitation en biotine ou après un choc thermique lors d'une culture en mode continu (Okino et al., 2005; Dietrich et al., 2009). Les études du métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* en anaérobie ont montré qu'en limitation d'oxygène, *Corynebacterium glutamicum* produit de l'acide L-lactique avec une productivité élevée mais également l'acide succinique et l'acide acétique (Okino et al., 2005). La voie de biosynthèse

du lactate est donc considérée comme une des principales voies chez *Corynebacterium glutamicum* sous les conditions de limitation d'oxygène (Figure 20).

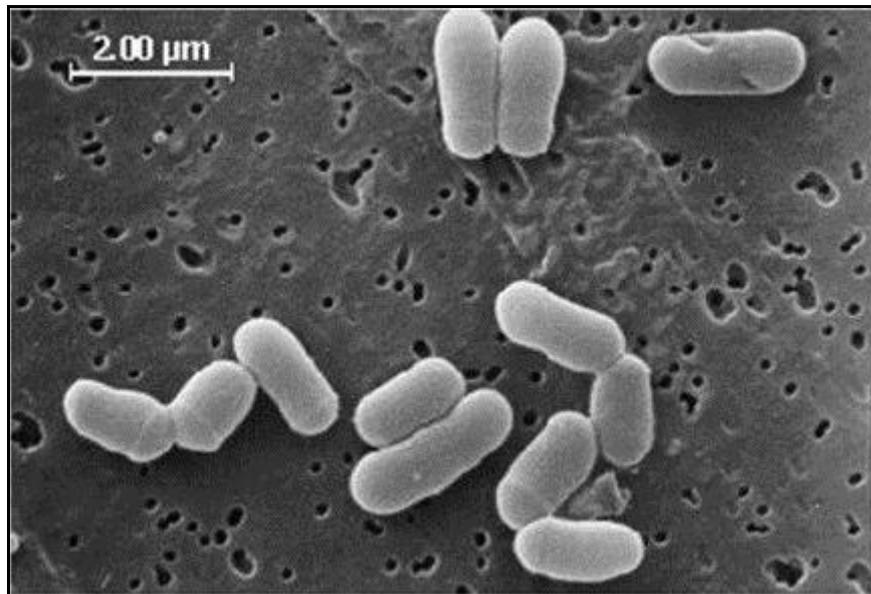


Figure 19. *Corynebacterium glutamicum*

(https://whymashen.files.wordpress.com/2011/03/coryne_sem.jpg)

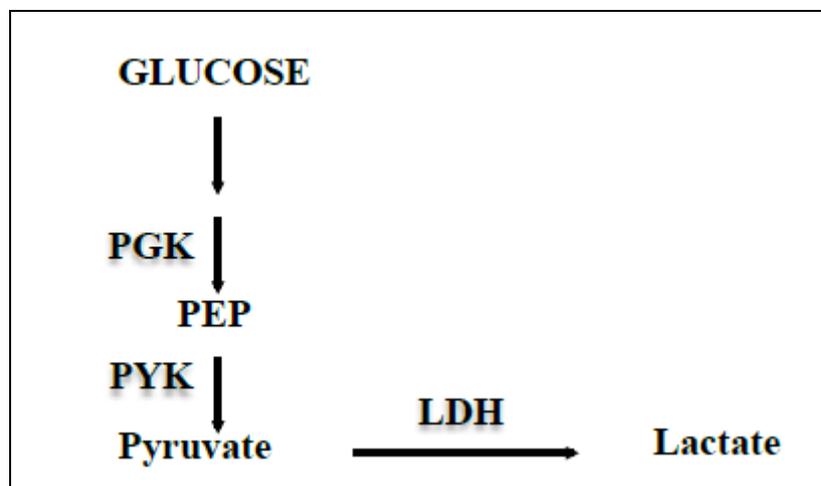


Figure 20. Voie de synthèse du lactate chez *Corynebacterium glutamicum*.

PGK, phosphoglycérate kinase; LDH, lactate déshydrogénase ; PEP, phosphoénolpyruvate ; PYK, pyruvate kinase

4.1.5. Culture mixte

Ce système n'est pas encore utilisé à l'échelle industrielle à cause des difficultés rencontrés au cours de l'optimisation des conditions de culture pour chaque souche, tels que le pH, la

température, la demande en oxygène et la composition du milieu de culture. Plusieurs travaux ont été entrepris dans ce sens, *Lactobacillus casei* et *lactococcus lactis* à partir du lactosérum, *Aspergillus auror* et *Streptococcus lactis*, *Enterococcus casseeliflavus* et *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus casei* et *Lactobacillus delbruckii*. Une culture mixte de *Lactobacillus pentosus* et de *Lactobacillus brevis* a été utilisée pour produire d'acide lactique à partir d'hémicellulose de paille de blé (Ghaffar *etal.*, 2014).

D'autres utilisent les mutations génétiques pour la production d'acide lactique. Les besoins nutritifs complexes des bactéries lactiques et l'inhibition de ces bactéries par la production d'acide lactique ont mené au développement des souches génétiquement modifiés de *Escherichia coli* capable de croître et de produire les deux isomères d'acide lactique sur un milieu synthétique contenant les sucres, l'azote inorganique et les éléments minéraux (Chotani *et al.*, 2000; Dien *et al.*, 2001).

Tableau 14. Caractéristiques des microorganismes producteurs d'acide lactique (Litchfield et al., 2009).

Microorganismes	Isomère d'acide lactique	Type de fermentation	Matières premières
Bactéries			
<i>Bacillus</i> sp.	L(+)	Homofermentaire	Bagasse de canne à sucre
<i>Enterococcus faecalis</i>	L(+)	Homofermentaire	mélasse de canne à sucre
<i>Escherichia coli</i> (génétiquement modifié)	L(+) ou D(-)	Homofermentaire	Glucose, saccharose, mélasses
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	L(-)	Homofermentaire	Amidon
<i>L. amylovorus</i>	DL	Homofermentaire	Amidon
<i>L. casei. rhamnosus</i>	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, saccharose, mélasses
<i>L. coyneformis</i> subsp. <i>torquens</i>	D(-)	Homofermentaire	Enzyme- converted cardboard
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	D(-)	Homofermentaire	Petit lait de fromage and permeate, lactose
<i>L. helveticus</i>	DL	Homofermentaire	Lactosérum, lactose
<i>Lactococcus lactis</i>		Homofermentaire	Glucose, lactose
Champignons	L(+)		
<i>Rhizopus arrhizus</i>	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, xylose, amidon
<i>R. oryzae</i>		Hétérofermentaire	Glucose, xylose, amidon
Levures (génétiquement modifié)			
<i>Kluyveromyces lactis</i>	L(+)	Homofermentaire	Glucose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose
<i>Pichia stipitis</i>	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, xylose

4.2. Les champignons

Les souches de moisissures sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique (Litchfield, 1996) sont *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delmar*, *Rhizopus oryzae* et *Rhizopus stalmifer*. Elles ont un métabolisme hétérofermentaire et elles produisent de l'acide lactique L (+). Le genre *Rhizopus* comme *Rhizopus oryzae* et *Rhizopus arrhizus* possèdent des enzymes amylolytiques capables de transformer l'amidon en acide L(+) lactique (Wee et al., 2006).

La supplémentation en source azotée ou en vitamines n'est pas nécessaire (Litchfield et al., 2009). Cependant, les performances restent limitées et les étapes de séparation restent complexes pour une souche hétérofermentaire obligatoire. Enfin l'extrapolation à l'échelle industrielle semble difficile (Litchfield et al., 2009; Ghaffar et al., 2014).

4.3. Les levures

Kluyveromyces lactis et *Kluyveromyces marxianus* sont génétiquement modifiées pour produire l'acide L-lactique (Bianchi et al., 2000; Ghaffar et al., 2014). *Saccharomyces cerevisiae* est génétiquement bien caractérisée, très utilisée industriellement, tolère le pH acide par rapport aux bactéries lactiques (Ghaffar et al., 2014). La levure *Pichia stipitis* génétiquement modifiée est également utilisée pour produire l'acide L-lactique à partir du xylose (Ilmen et al., 2007) (Tableau 14).

5. Applications de l'acide lactique

5.1. L'industrie des polymères

L'acide lactique pure peut être polymérisé en acide poly lactique à travers une série de réactions de polycondensation, de dépolymérisation et de polymérisation (Figure 21) (Xiao et al., 2012).

Les nouvelles applications de l'acide lactique sont essentiellement dues à sa forme polymérisée: (poly-lactique acide). Les poly-lactiques acides sont biodégradables (Figure 22). Leurs applications sont multiples et très variées (Tableau 15): médecine (fils résorbables, implants biodégradables) (Xiao et al., 2012), alimentaire (sacs) pour remplacer le plastique conventionnel, agriculture (système de relargage pour engrais et pesticides) (Ren, 2010).

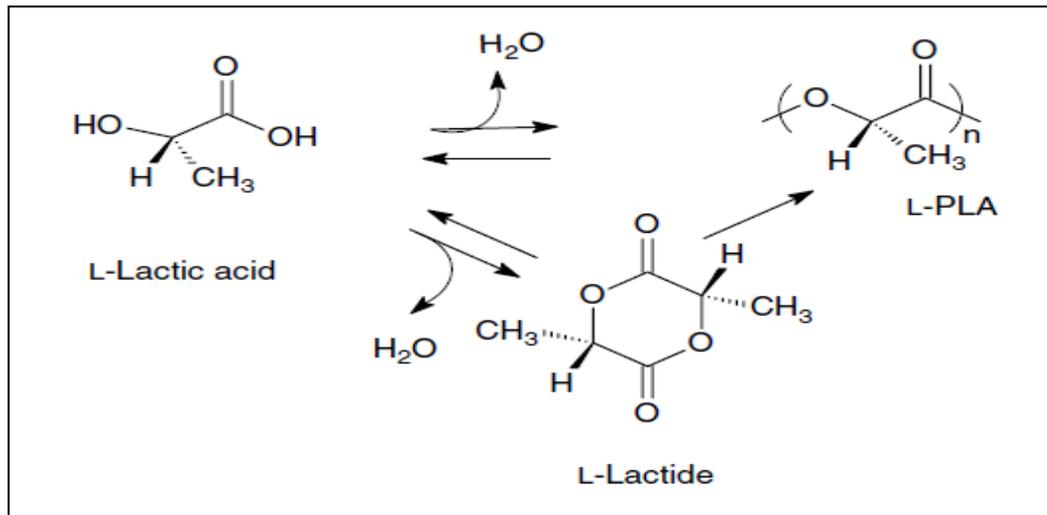


Figure 21. Les voies de polymérisation vers l'acide poly-lactique (Henton et al., 2005).

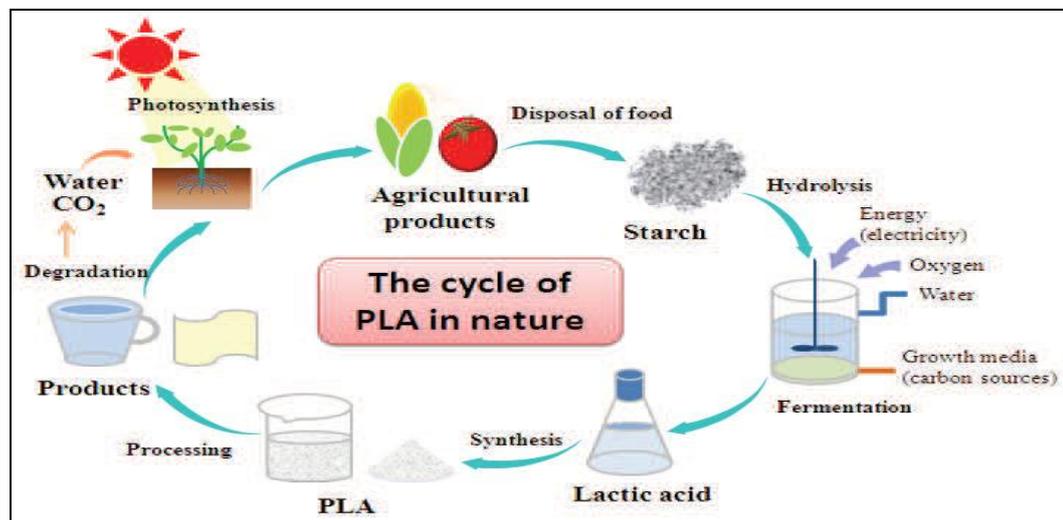


Figure 22. Cycle du poly-lactique acide dans la nature (Xiao et al., 2012).

Tableau 15. Les différentes applications des PLA (Vijayakumar et al., 2008).

Produits	Utilisations
Plastiques dégradables	Emballages, films
Produits oxychimiques	
Propylène glycol	Polymères, alimentaires, humectants
	Polymères, films plastiques, revêtements
Acrylates	Polymères, plastiques
Propylène oxyde	Plastifiants, traitement des aliments
"vert" produits chimique/ solvants:	emballage
Esters	comme ci-dessus
Dérivés d'ester	
Régulateurs de croissance des plantes	Film de paillis pour légumes et
Poly-L-lactates	Cultures fruitières

5.2. L'industrie alimentaire

L'acide lactique peut être ajouté dans différents aliments transformés, habituellement pour l'ajustement du pH ou comme agent de conservation (un antioxydant ou bien pour le contrôle des microorganismes pathogènes) (Narayanan, 2004).

Il peut également être utilisé comme un amplificateur de fermentation dans le seigle et le pain (Borgardt et al., 1998). Le lactate de potassium est utilisé dans différents produits à base de viandes fraîches ou cuites pour le contrôle de la durée de conservation, la conservation de la couleur et pour la réduction du contenu en sodium (Ren, 2010). Le lactate de sodium est utilisé comme un exhausteur de goût (Ren, 2010).

Le lactate est largement utilisé comme un agent antimicrobien pour réduire le nombre de bactéries pathogènes comme *E. coli*, *Salmonella p.*, *Campylobacter sp.* et *Listeria sp.*, dans la viande d'animaux comme le bœuf et la volaille au cours du processus d'abattage (Ren, 2010).

5.3. L'industrie cosmétique

En cosmétique, le lactate de sodium et de calcium sont utilisés pour leurs propriétés humectantes (Vijayakumar et al., 2008). Les acyle-lactate sont connus pour leurs propriétés

émulsifiantes, épaississantes et stabilisantes (Vijayakumar et *al.*, 2008). L'acide lactique est utilisé dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux, réduire les effets de vieillissement et dans les dentifrices comme agent détartrant (Narayanan, 2004; Vijayakumar et *al.*, 2008; Komesu et *al.*, 2017).

5.4. L'industrie pharmaceutique

L'acide lactique et l'éthyle lactate ont longtemps été utilisés dans des applications pharmaceutiques, particulièrement dans les lotions, les solutions parentérales, les solutions de dialyse et les solutions anti-acné (Narayanan, 2004; Ren, 2010). Les polymères biodégradables possèdent des applications médicales comme les sutures chirurgicales (fils résorbables), les implants orthopédiques biodégradables, et la libération contrôlée de médicaments dans des fibres creuses, elles mêmes biodégradables (Vijayakumar et *al.*, 2008; Komesu et *al.*, 2017).

1.1. L'industrie chimique

L'acide lactique est considéré comme le potentiel monomère des conversions chimiques des matières premières car il contient deux groupes réactif fonctionnels, le groupe carboxylique et le groupe hydroxyle (Vijayakumar et *al.*, 2008). L'acide lactique peut subir différentes conversions en produits chimiques potentiellement utiles, comme l'oxyde de propylène (via l'hydrogénation), l'acétaldéhyde (via la décarboxylation), l'acide acrylique (via la déshydratation), l'acide propénoïque (via la réduction), 2,3-pentanedione (via la condensation) et le dilactide (via l'auto-estérification) (Figure 23) (Vijayakumar et *al.*, 2008). En chimie industrielle, l'acide lactique est utilisé dans la teinture des soies et autres produits textiles, comme mordant dans l'impression de lainages (Vijayakumar et *al.*, 2008; Komesu et *al.*, 2017). Dans l'industrie des plastiques, l'acide lactique est utilisé comme un agent de détartrage, un régulateur de pH, un neutralisateur, un solvant intermédiaire chirale, un agent de nettoyage, un agent antimicrobien et humectant, un agent des métaux complexes (Ren, 2010). L'acide lactique naturel a une utilisation émergente comme un solvant excellent et sûr. Grace a son grand pouvoir de solvabilité et de solubilité, il constitue un excellent éliminateur de polymères et de résines (Vijayakumar et *al.*, 2008).

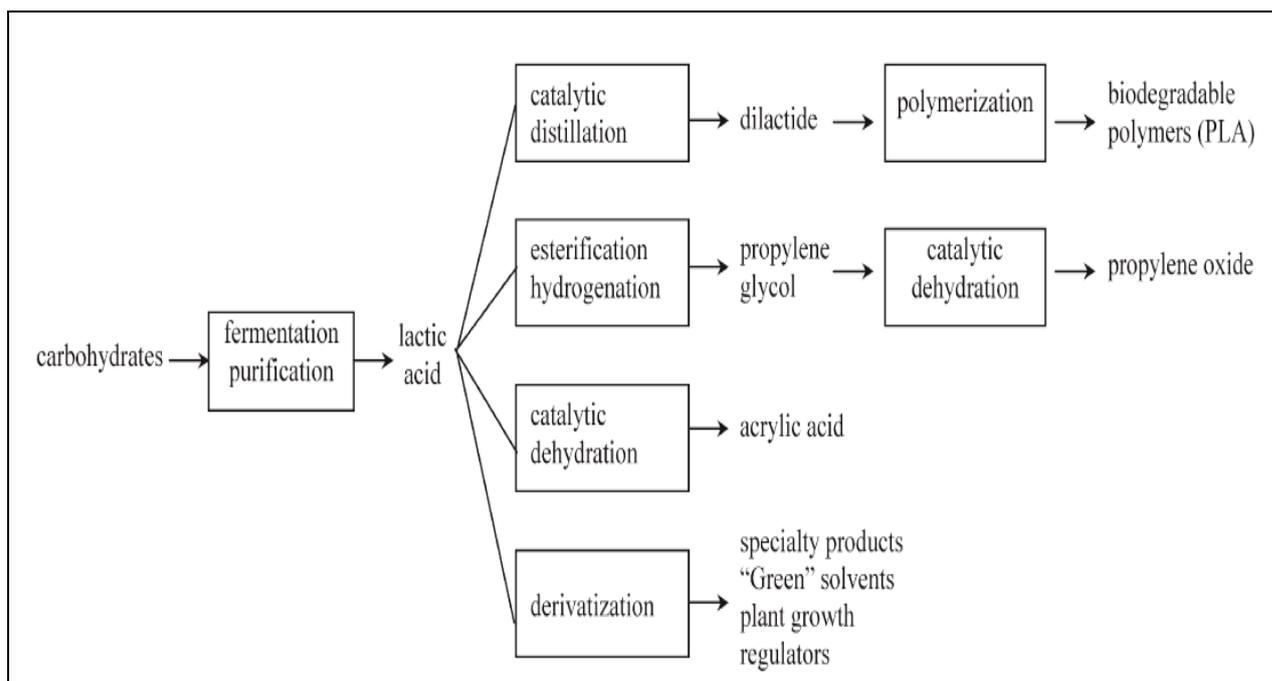


Figure 23. Potentiels produits technologiques de l'acide lactique (Vijayakumar et *al.*, 2008).

5.6. Autres utilisations

Les ester alkyl, comme l'éthyle et butyle lactate sont une bonne alternative aux éthers glycol et autres solvants grâce à leur faible toxicité (Vijayakumar et *al.*, 2008; Narayanan, 2004). L'éthyle L(+) lactate est un remplaçant avantageux de certains solvants toxiques pour le nettoyage de métaux de précision pour l'électronique, l'aérospatiale et les industries des semi-conducteurs (Vijayakumar et *al.*, 2008).

6. Matières premières utilisées pour la production d'acide lactique

L'un des principaux défis dans la production d'acide lactique à grande échelle est le coût de la matière première. Par conséquent, l'utilisation de matières premières moins coûteuses est requise pour rendre le procédé industriellement rentable. Les caractéristiques souhaitées pour les matières premières sont un prix relativement bas, de faibles niveaux de contaminants, des taux de production rapides, des rendements de production élevés, une réduction de la formation de sous-produits et une bonne capacité à être fermentées sans prétraitements lourds (Wee, et *al.*, 2006; Randhawa et *al.*, 2012). Plusieurs procédés de production d'acide lactique utilisant des matières premières peu coûteuses ont été largement étudiés.

Le Tableau 14 montre les matières premières utilisées pour la production d'acide lactique par les bactéries, les champignons et les levures.

6.1. Les monosaccharides et les disaccharides

Les sources de sucre contenant des pentoses ou bien des hexoses peuvent être utilisées pour la production d'acide lactique (Martinez et *al.*, 2013). Dans cette catégorie de sources on retrouve les sous-produits de l'industrie agroalimentaire comme les mélasses et le lactosérum (Martinez et *al.*, 2013). Les mélasses contiennent une teneur élevée de saccharose et ils sont abondants avec un prix bas (Kotzamanidis et *al.*, 2002). Le lactosérum a une teneur élevée de lactose ce qui lui dispose un défi environnemental sérieux (Alvarez et *al.*, 2010).

6.2. Les polysaccharides

Les substrats qui contiennent les polysaccharides, sont généralement non assimilables par les micro-organismes. Ces substrats nécessitent une hydrolyse préalable, comme l'amidon (Maïs, blé, pomme de terre, manioc, riz, sorgho sucré), et la lignocellulose (Épis de maïs, déchets de papier et matériaux ligneux) (Figure 24) (Massoud et Elrazek, 2011; Bayitse, 2015). Des exemples comprennent les amidons solubles, les amidons crus et l'hydrolysate enzymatique de son de blé, son de riz, soja, tiges, manioc, les sucres de bagasse de canne (Litchfield et *al.*, 2009). Certaines bactéries lactiques telles que *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus amylophilus* et *Lactobacillus amylovorus*), *Streptococcus bovis*, et certains champignons tels que *Rhizopus* spp. (*Rhizopus arrhizus* et *Rhizopus oryzae*), ont une activité enzymatique amylolytique capable de convertir l'amidon en glucose (Litchfield et *al.*, 2009). La biomasse du bois contient l'hémicellulose, de la cellulose et de la lignine doit subir un traitement chimique, physique ou enzymatique pour obtenir des sucres fermentescibles et pour séparer la lignine (Litchfield et *al.*, 2009; Martinez et *al.*, 2013).

Le processus de saccharification fermentation simultanées (SSF) (Simultaneous saccharification and fermentation) implique l'ajout des enzymes comme les cellulases ou les amylases pour hydrolyser la cellulose ou l'amidon, pour fournir le glucose nécessaire durant la fermentation lactique (Litchfield et *al.*, 2009; Martinez et *al.*, 2013). Plusieurs substrats cellulosiques ont été étudiés par le processus (SSF) conversion en acide lactique tels que la cellulose, les fibres de luzerne, le son de riz dégraissé, les déchets du papier, le cambouis de moulin à papier, la boue de papeterie, les foins prétraités, et les déchets du carton (Litchfield et *al.*, 2009).



Figure 24. Matières lignocellulosiques utilisées pour la production d'acide lactique (Ghaffar et *al.*, 2014).

IV. LES PLANS D'EXPERIENCES

1. Généralités

La recherche de conditions optimales de production est très importante en analyse fondamentale pour l'industrie et l'ingénierie. En effet optimiser une production ou même un système c'est aboutir à un rendement maximal.

Les expériences au laboratoire ou en contexte industriel concernant généralement l'étude de l'influence de nombreux facteurs sur les résultats d'un phénomène ou d'un procédé. Pendant longtemps la procédure expérimentale consiste à faire varier un facteur à la fois en maintenant fixe tous les autres facteurs. L'utilisation d'un plan d'expérience où plusieurs facteurs varient à la fois, a permis d'alléger l'expérimentation en terme de temps et de coûts, tout en permettant l'étude des interactions entre les facteurs et en augmentant la précision des estimations des effets.

Les plans d'expériences permettent d'organiser au mieux les essais qui accompagnent une recherche scientifique ou des études industrielles (Goupy, 2001).

Cependant, dans tout problème d'optimisation il intervient toujours les concepts de variables opératoires et de réponse et avec les plans d'expériences on obtient le maximum de renseignements avec le minimum d'expériences.

La méthode des plans d'expériences peut être utilisée dans deux types d'investigations:

- Les études de criblage ou screening,
- Les études de surface de réponse (MSR).

La technique du screening permet de déterminer, parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur, ceux qui ont une influence statistiquement non négligeable sur les variations de la réponse. On procède ainsi implicitement à une simplification du problème. En plus des facteurs influents, il est également possible d'identifier les interactions des facteurs qui auront une influence significative sur la réponse.

Dans une application de la méthodologie de surface de réponse (MSR), les variations de la réponse sont calculées en fonction des facteurs et des interactions précédemment jugés influents.

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées.

1.1. Notion d'espace expérimental

La réponse y : C'est la grandeur d'intérêt qui correspond à la grandeur physique étudiée ; La valeur de cette grandeur dépend de plusieurs variables appelés facteurs x . C'est derniers correspondent aux grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur et sensées influencer sur les variations de la réponse.

La réponse dépend donc d'un ou de plusieurs facteurs. Le premier facteur peut être représenté par un axe gradué et orienté (Figure 25). La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas. La borne supérieure est le niveau haut.

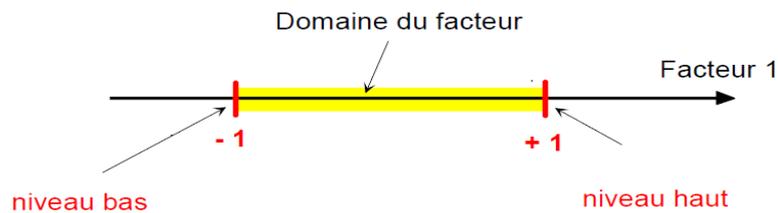


Figure 25. Domaine de variation d'un facteur (Goupy, 2006).

1.2. Notion de surface de réponse (Goupy, 2006)

Les niveaux x_i représentent les coordonnées d'un point expérimental et y est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences et de la réponse nécessite un espace ayant une dimension de plus que l'espace expérimental. Un plan à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté: une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 26).

Les quelques réponses mesurées aux points du plan d'expériences permettent de calculer l'équation de la surface de réponses.

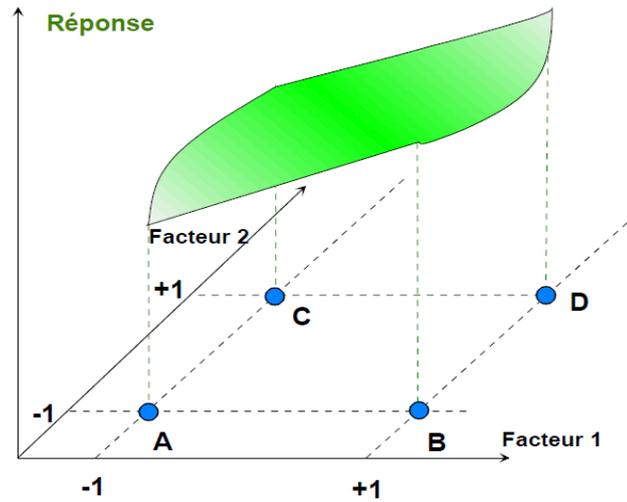


Figure 26. Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy, 2006).

1.3. Notion de modélisation mathématique

On choisit a priori une fonction mathématique qui relie la réponse aux facteurs. On prend un développement limité de la série de Taylor-Mac Laurin. Les dérivées sont supposées constantes et le développement prend la forme d'un polynôme de degré plus ou moins élevé:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ij} x_i x_j + \dots + \sum a_{ii} x_i^2 + a_{ij\dots z} x_i x_j \dots x_z$$

- y est la réponse ou la grandeur d'intérêt. Elle est mesurée au cours de l'expérimentation et elle est obtenue avec une précision donnée.
- x_i représente le niveau attribué au facteur i par l'expérimentateur pour réaliser un essai. Cette valeur est parfaitement connue. On suppose même que ce niveau est déterminé sans erreur (hypothèse classique de la régression).
- a_0, a_i, a_{ij}, a_{ii} sont les coefficients du modèle mathématique adopté a priori. Ils ne sont pas connus et doivent être calculés à partir des résultats des expériences.

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences.

Ce modèle est appelé "*modèle postulé*" ou "*modèle a priori*".

2. Types de plans d'expériences

La différenciation entre les différents types de plans d'expériences se fait souvent selon que les facteurs sont indépendants ou pas.

2.1. Plans de criblage

Ces plans permettent de découvrir les facteurs les plus influents sur une réponse. On ne cherche pas à obtenir une relation précise entre les variations des facteurs et celles des réponses. On distingue:

Plans "un facteur à la fois": seuls les effets principaux sont connus. On n'obtient aucune interaction.

Plans factoriels fractionnaires:

2.1.1. Les plans de Plackett et Burmann

Les matrices de calcul des plans de Plackett et Burman sont des matrices d'Hadamard. C'est-à-dire des matrices ayant 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36 lignes, etc. Elles permettent donc des expérimentations ayant un nombre d'essais intermédiaire de celui des plans factoriels qui, eux, ont seulement $2k$ lignes (4, 8, 16, 32, etc.).

Les plans de Plackett et Burman sont le plus souvent saturés. Le modèle mathématique est alors un modèle sans interaction analogue à celui des plans de Koshal:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i$$

2.1.2. Les plans de Taguchi

Une partie majeure de ce qui est connu comme la méthode de Taguchi est l'utilisation de tables orthogonales. C'est une représentation analogue aux tables de Plackett et Burman basées sur des matrices orthogonales d'Hadamard. Ces tables ne sont pas propres à Taguchi, elles ont été découvertes plutôt. Ces plans factoriels fractionnaires sont basés sur l'emploi de sous-ensembles symétriques de toutes les combinaisons des niveaux de facteurs (plan complet correspondant).

2.1.3. Plans sursaturés

Ce sont des plans qui prennent en compte un grand nombre de facteurs et qui ne demandent que quelques essais.

2.1.4. Plans factoriels complets

Ils servent à faire du criblage et peuvent servir en modélisation.

2.2. Plans de modélisation

Plans factoriels complets: ces plans peuvent être utilisés pour la modélisation mais comme, il n'y a que deux niveaux par facteurs, on ne peut qu'employer des modèles du premier degré avec interactions.

Plans non conventionnels: tous plan qui s'écarte des plans classiques (niveaux ou emplacement décalés, manque de nombres d'expériences,...)

2.2.1. Les plans composites centrés

Les plans composites centrés ont pour base un plan factoriel complet ou fractionnaire à 2 niveaux (les niveaux mini et maxi des facteurs pour le plan factoriel sont codés -1 et +1). A cette base, on ajoute des points axiaux (toutes les combinaisons de $+\alpha$ ou $-\alpha$ ($\alpha > 1$) pour un facteur et 0 pour tous les autres, soit $2p$ points pour p facteurs) et des points au centre du domaine expérimental dont le nombre est lié à la valeur de α . En raison de leur construction, ces plans sont bien adaptés à une démarche séquentielle. En effet, on peut étudier dans un premier temps les effets principaux et leurs interactions avec un plan factoriel complet ou fractionnaire, et, si les points au centre du domaine montrent une courbure significative, on poursuit l'étude avec les points axiaux. Dans ce cas, il faut avoir anticipé ces éventuels essais de sorte que les valeurs $+\alpha$ ou $-\alpha$ soient possible (Chagnon, 2005).

Par ailleurs, ces plans nécessitent 5 niveaux non régulièrement répartis pour chacun des facteurs, ce qui peut poser des problèmes car 2 niveaux peuvent être trop proches pour être techniquement vraiment différents. Ces plans d'expériences sont robustes à des écarts aux niveaux fixés.

Toutefois, il est tout à fait possible de construire un plan composite centré pour plus de 6 facteurs.

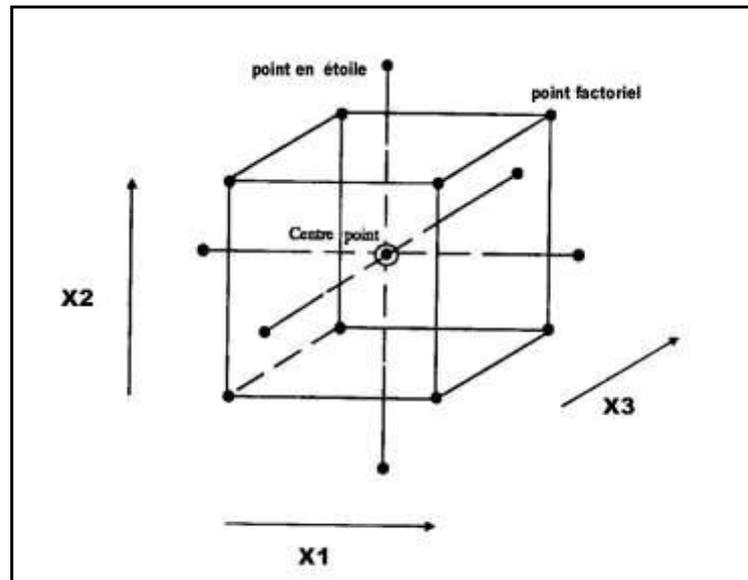


Figure 27. Plan de composite centré pour trois facteurs (Goupy, 2006).

2.2.2. Les plans de Box-behnken

Ce sont des structures symétriques dans lesquelles chaque facteur prend 3 niveaux. Ils sont la combinaison de plans factoriels à 2 niveaux, avec des blocs incomplets équilibrés suivant un arrangement particulier avec plusieurs essais au centre du domaine expérimental (Chagnon, 2005). Les plans de Box-Behnken répondent à un critère d'optimisation particulier: l'erreur de prévision des réponses est la même pour tous les points d'une sphère (ou une hyper sphère) centrée à l'origine du domaine expérimental. C'est le critère d'isovariance par rotation. Le plus connu des plans de Box-Behnken est celui qui permet d'étudier trois facteurs (Tableau 16).

Tableau 16. Plan de Box- Behnken pour 3 facteurs

N° d'essai	variables		
	X1	X2	X3
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	-1
4	-1	-1	-1
5	1	-1	1
6	-1	-1	1
7	-1	1	-1
8	-1	1	1
9	1	-1	-1
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	-1,681	0
17	0	1,681	0
18	-1,681	0	0
19	0	0	-1,681
20	0	0	1,681

2.2.3. Les plans hybrides

Ce sont des structures très particulières qui ont pour intérêt principal leur faible nombre d'essais par rapport aux 2 catégories précédentes. Cette caractéristique a cependant un

coût: les estimations sont de qualité médiocre et les plans hybrides sont peu robustes au non-respect des niveaux des facteurs (Chagnon, 2005).

2.2.4. Les plans de Doelert

Ces plans se singularisent par 2 spécificités:

- la possibilité, après un premier plan de Doelert, d'ajouter un ou plusieurs facteurs, si l'on a pris la précaution de fixer ce ou ces facteurs à un niveau intermédiaire au cours de la première étape ;
- la possibilité de se déplacer dans le domaine expérimental dans une direction donnée pour un coût expérimental limité (Chagnon, 2005).

2.2.5. Les plans de Roquemore

Ces plans nécessitent peu d'essais pour obtenir un modèle du second degré.

2.2.6. Les plans D-optimaux

Ces plans assurent une bonne précision sur les coefficients du modèle prédictif (Goupy, 2006).

DEUXIEME PARTIE :
MATERIEL ET METHODES

1. Souches utilisées et conditions de conservation

Deux souches principales de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ont été utilisées lors de ce travail : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20). Deux autres souches ont été également testées: *Lactobacillus casei* et *Corynebacterium glutamicum* 2262.

Les souches *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 et *Corynebacterium glutamicum* 2262 proviennent du "Laboratoire Réactions et Génie des Procédés" (LRGP), (Institut National Polytechnique de Lorraine Nancy - France). Les souches *Lactococcus lactis* subsps. *lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei* sont des souches indigènes isolées respectivement du lait de chamelle et de leben proviennent du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Université Ferhat Abbas Sétif 1. Les bactéries sont conservées au congélateur à -20°C dans les milieux MRS, M17 et MCGC pour *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Corynebacterium*, respectivement. Chaque milieu est additionné de 20% de glycérol.

2. Milieux de cultures

2.1. Milieu de préculture

Il s'agit de:

-**Milieu M17** (Terzaghi et Sandine, 1975) utilisé pour la croissance de *Lactococcus lactis*, dont la composition est illustrée dans le Tableau 17.

Tableau 17. Composition du milieu M17.

Composition	Concentration (g/l)
Tryptone	2,5
Peptone pepsique de viande	2,5
Peptone papanoïque de soja	5
Extrait autolytique de levure	2,5
Extrait de viande	5
Lactose	5
β-Glycérophosphate de sodium	19
Sulfate de magnésium	0,25
Acide ascorbique	0,5

-**Milieu MRS** (de Man et *al.*,1960) est utilisé pour la croissance *Lactobacillus casei*, la composition de milieu MRS est illustrée dans le Tableau 18.

Tableau 18. Composition du milieu MRS.

Composition	Concentration (g/l)
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

- **Milieu BMCG (Basal Medium Corynebacterium Growth)** est utilisé pour la croissance de *Corynebacterium glutamicum*. La composition de milieu BMCG est illustrée dans le Tableau 19, le pH de milieu est ajusté à 7.

Tableau 19. Composition du milieu BMGC.

Composition	Concentration
Glucose	34 g/l
Na ₂ HPO ₄	15 g/l
KH ₂ PO ₄	3 g/l

Suite du Tableau 19.

Composition	Concentration
NaCl	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	400 mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	40 mg/l
FeCl ₃	4 mg/l
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mg/l
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,4 mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	4 mg/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,2 mg/l
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	0,4 mg/l
CaCl ₂	84 mg/l
Biotine	2 mg/l
Thiamine	20 mg/l
Urée	4 g/l

2.2. Milieu de production d'acide lactique

Le milieu de production contient essentiellement de l'extrait sucré de fruits et/ou l'hydrolysate des cladodes d'*Opuntia ficus indica*. Ce milieu a servi de point de départ aux expérimentations, car il ne s'agit en aucun cas d'un milieu de culture optimal. En effet, ce milieu a été enrichi en azote et en sels minéraux. La composition du milieu et les conditions de culture ont été optimisés après plusieurs séries de fermentations. Ce milieu regroupe les exigences des souches utilisées en source de carbonée, azotée, en sels minéraux et en vitamines. La composition variera en fonction des expériences réalisées : source carbonée, azotée ou sels minéraux.

2.3. Milieux de dénombrement bactérien

- **Milieu M17 agar** est utilisé pour le dénombrement de *Lactococcus lactis*, la composition du milieu M17 agar est illustrée dans le Tableau 20.

Tableau 20. Composition du milieu M17 agar.

Composition	Concentration (g/l)
Peptone de caséine	2,5
Peptone de viande	2,5
Peptone de soja	5
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
β -glycérophosphate de sodium	19
Sulfate pentahydrate de magnesium	0,25
Acide ascorbique	05
Agar	12,75

- **Milieu MRS agar** est utilisé pour le dénombrement de *Lactobacillus casei*, la composition du milieu MRS agar est illustrée dans le Tableau 21.

Tableau 21. Composition du milieu MRS agar.

Composition	Concentration (g/l)
Peptone universelle	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5

Suite du Tableau 21.

Composition	Concentration (g/l)
D(+) Glucose	20
Dipotassium phosphate d'hydrogène	2
Diammonium citrate d'hydrogène	2
Acétate de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,1
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	12

- **Milieu LB** (Luria-Bertani ; Miller, 1972) est utilisé pour le dénombrement de *Corynebacterium glutamicum*. La composition de milieu LB est illustrée dans le Tableau 22. Son pH final est de 7.0.

Tableau 22. Composition du milieu LB.

Composition	Concentration(g/l)
Bactopeptone	10
NaCl	10
Glucose	20
Extrait de levure	5
Agar	15

3. Stérilisation

La stérilisation des milieux et des solutions est réalisée par filtration ou par autoclavage.

- Les milieux de culture sont autoclavés 20 minutes sous 1 bar (120°C). Il faut noter que certaines solutions sont stérilisées séparément afin d'éviter les réactions de brunissement non enzymatique.
- Les solutions de vitamines sont stérilisées par filtration sur filtres Minisart 0,2 µm.

4. Appareil et produits chimiques

Appareillage pour cultures

- Erlenmeyers de 250 ml,
- Bain-marie, Bioblock scientifique,
- Etuve bactériologique, Memmert,
- Incubateur avec son système d'agitation et de régulation de température, New Brunswick scientifique.

Matériel pour mesure analytique

- Spectrophotomètre, Spectronic 20 Genesys
- pH-mètre, Prolabo

Autres

- Autoclave, Slecta
- Agitateur magnétique, Fischer scientifique
- Balance de précision, Kem ALJ 220-4M
- Balance, Ohaus
- Centrifugeuse, Hettich EBA 12
- Centrifugeuse, Sigma 3-16 PK
- Vortex, Stuart
- Pipettes automatiques, Gilson

Produits chimiques pour les cultures

- Hydrolysate de caséines, Sigma
- K_2HPO_4 , Sigma
- KH_2PO_4 , Sigma
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Merck
- NaCl, Prolabo
- $MnSO_4 \cdot H_2O$, Prolabo
- Peptone, Sigma
- Urée, Sigma

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Prolabo
- FeCl_3 , Panreac
- CaCl_2 , Fluka
- Na_2HPO_4 , Fluka
- Liqueur de "corn steep", Sigma
- Extrait de levure, Sigma
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sigma
- Tryptone, Sigma
- $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Sigma
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma
- $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Fluka
- Glucose, Prolabo
- Lactose, Prolabo
- Saccharose, Prolabo
- Glycérol, Prolabo
- NaOH, Merck
- M17, Sigma
- MRS, Sigma

Produits chimiques pour analyses

- Acide sulfurique 96%, Sigma
- Acide dinitrosalicylique, Sigma
- Ethanol, 96%, Sigma
- P-phénylphénol, Sigma
- Tartrate de Sodium et de Potassium,
- $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Sigma
- CH_3COONa , Sigma
- DNS (acide di-nitrosalicylique), Sigma
- Cellulase, *Trochoderma reesei* ATCC 26921 (I.U.B.:3.2.1.4 Worthing Biochemical Corporation)
- Kit enzymatique (Glucose PAPSL Elitech)

Vitamines

- Riboflavine, Sigma

- Thiamine, Sigma
- Pantothénate, Sigma
- Nicotinate, Sigma
- Pyrodoxine, Sigma
- Acide p-dinobenzoïque, sigma

5. Matériel végétal.

5.1. Description du matériel végétal

Le matériel végétal présent dans le site d'étude est composé d'une population constituée d'individus ayant des raquettes épineuses et des fruits ovoïdes, et une pulpe de couleur jaune orangée.

5.2. Prélèvement des échantillons

Le matériel végétal (fruits et cladodes) d'*Opuntia ficus indica* étudié provient de la région de Dhamcha (Ain Elkbira) Wilaya de Sétif, a été récolté à partir du mois de juillet jusqu'au mois de septembre pour le fruit et durant l'année pour les cladodes. Les fruits et les cladodes sont prélevés au hasard à diverses hauteurs sur des figuiers homogènes. Ces derniers ont été immédiatement conservés à une température de 4 °C.

5.3. Préparation du jus de fruits et de la poudre de cladodes

5.3.1. Préparation du jus de fruits d'*Opuntia ficus indica*

Les fruits sont épluchés à la main, puis séchés dans une étuve ventilée à 60°C pendant 72 heures à l'étuve (Figure 28). 50 grammes de fruits secs sont introduits dans 100 ml d'eau distillée et chauffés à 100°C pendant 45 minutes dans un bain marie. Les graines sont séparées par filtration à l'aide d'un tissu. L'extrait du jus obtenu est centrifugé à 4000 rpm et à une température de 4°C pendant 20 minutes afin de séparer les débris cellulotiques. Le surnageant recueilli est utilisé essentiellement en tant que source de carbone après avoir été dilué aux proportions convenables en fonction de la concentration en sucres recherchée.



Figure 28 (a,b,c). Représentation des étapes de séchage de fruits d'*Opuntia ficus indica*

5.3.2. Préparation de la poudre de raquettes

Les raquettes sont d'abord bien lavées, puis coupées en dés. Ces derniers sont séchés dans une étuve ventilée à 60°C pendant 24 heures (Figure 29). Ensuite, ils sont mixés puis tamisés afin d'obtenir une poudre fine. La poudre de raquette obtenue est hydrolysée par une hydrolyse enzymatique (cellulase) et/ou par une hydrolyse acide (acide sulfurique) afin de récupérer les sucres fermentescibles.



Figure 29 (a,b,c,d). Représentation des étapes de séchage des raquettes d'*Opuntia ficus indica*

5.3.2.1. Hydrolyse acide (chimique)

La poudre des cladodes est répartie dans des tubes à essai à raison de 1 g en présence d'une solution de 10 ml d'H₂SO₄ dilué (1,5 à 5,5%). Les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant une nuit. Ces derniers sont traités à différents temps de traitement (40 à 80 minutes) et à différentes températures (80 à 120°C) (Tableau 23).

L'hydrolysats est filtré à l'aide d'un tissu perforé, puis centrifugé à 10.000 rpm pendant 10 minutes.

5.3.2.2. Hydrolyse enzymatique

La poudre de cladode est répartie dans des Erlenmeyers à raison de 2,5 g en présence d'une solution de 25 ml de cellulase dilué de 30,5 UI/g. Le pH est ajusté à 4,5 par l'acide acétique. Les Erlenmeyers sont incubés dans un incubateur rotateur sous une vitesse d'agitation de 234 rpm à 47°C et un temps d'incubation de 20 heures. Ensuite l'hydrolysats est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes et le surnageant récupéré est chauffé à 100°C pendant 5 minutes.

6. Procédure de culture

6.1. Conservation des souches

Des cultures de chacune des souches ont été réalisées en milieux de préculture, la croissance est arrêtée en phase de croissance exponentielle et un volume de glycérol (20%) est rajouté à chaque suspension cellulaire. La suspension bactérienne et par la suite répartie dans des eppendorfs stériles, puis congelé à - 20°C.

6.2. Préparation des précultures

Les cultures stocks ont été décongelées au fur et à mesure des besoins, puis utilisées. L'eppendorf de conservation sert à inoculer le milieu de préculture. Cette dernière est prise à l'ensemencement en phase de croissance exponentielle (4h pour *Lactobacillus casei*, 6h pour *Lactococcus lactis* (Lc 20), 8h pour *Corynebacterium glutamicum* 2262 et 12h pour *Lactococcus lactis* ATCC 19435). L'âge de l'inoculum a été optimisé pour les différentes souches.

6.3. Fermentations en cultures discontinues

Les fermentations sont réalisées dans des Erlenmeyers de 250 ml avec un volume réactionnel de 100 ml. Après avoir ajusté le pH à 6, les Erlenmeyers sont inoculés avec 10% d'inoculum puis incubés dans un incubateur avec son système d'agitation et de régulation de température à différents temps de fermentation (de 24 à 56 heures) sous une agitation de 200 rpm et une température de 33,5°C ou de 38°C selon la souche utilisée (Serna Cock et Rodríguez de Stouvenel, 2006). Pour les cultures mixtes, une température de 33,5°C a été utilisée. Le pH est maintenu constant grâce à un tampon phosphate.

Les Erlenmeyers ont l'avantage de pouvoir mener plusieurs dizaines de fermentations, en même temps, à un coût plus faible, et avec une mise en œuvre plus aisée. La stérilisation des Erlenmeyers se fait à l'autoclave.

Pour suivre l'évolution des fermentations, des prélèvements de 1 ml chaque heure ont été effectués au cours du temps, pour l'analyse de la croissance, des sucres et de l'acide lactique.

7. Méthodes analytiques

7.1. Estimation de la croissance

7.1.1. Turbidimétrie

La croissance bactérienne est estimée en mesurant directement l'absorbance de l'échantillon prélevé à 650 nm pour *Lactococcus lactis*, 620 nm pour *Lactobacillus casei* et 570 nm pour *Corynebacterium glutamicum* à l'aide d'un spectrophotomètre.

7.1.2. Dénombrement bactérien

Afin de procéder au dénombrement d'un échantillon, des dilutions décimales ont été réalisées dans de l'eau physiologique stérile [0,9% NaCl (p/v)]. 100 µl de la culture diluée a été appliquée en surface sur des géloses (MRS, M17, LB) en boîtes de Pétri, à l'aide d'un râteau. Deux boîtes par dilution ont étéensemencées et l'incubation a été réalisée à 33,5°C pendant 2 à 3 jours.

Pour la lecture, les colonies développées dans les boîtes ont été comptées. Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies ont été interprétables.

Le résultat est donné par la formule suivante:

$$X \text{ (UFC/ml)} = \frac{\Sigma (\text{colonies} \times \text{dilution})}{n}$$

Avec

n: nombre de boîtes comptées (2 boites par dilution)

UFC: Unité Formant Colonie

7.2. Dosage des sucres

7.2.1. Dosage des sucres totaux (Dubois, 1956)

A 1 ml de l'échantillon, 1ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique concentré sont ajoutés, suivi d'un repos de 10 minutes puis une incubation de 20 minutes à 30°C au bain marie. La densité optique est mesurée à 488 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre une gamme étalon. Cette méthode est basée sur le développement d'une coloration sous l'effet de l'acide sulfurique concentré qui à chaud provoque le départ de plusieurs molécules d'eau à partir des alcools des oses. Cette déshydratation s'accompagne par la formation d'un hydroxyméthylfurfural dans le cas d'un hexose et d'un furfural dans le cas d'un pentose. Ces composés se condensent avec le phénol pour donner des complexes colorés (jaune-orangé). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'ose en cause.

7.2.2. Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs (en raison de leurs groupements carbonyle libres C=O) réagissent avec le DNS (acide di-nitrosalicylique) jaune en le réduisant en acide 3-amino-5-nitrosalicylique orange présentant un maximum d'absorption à 540 nm selon la réaction décrite sur la Figure 30. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la teneur en sucres (Miller, 1959).

Les teneurs en sucres sont déterminés en référence à une gamme étalon de glucose pour les concentrations comprises entre 0 et 2 g/l.

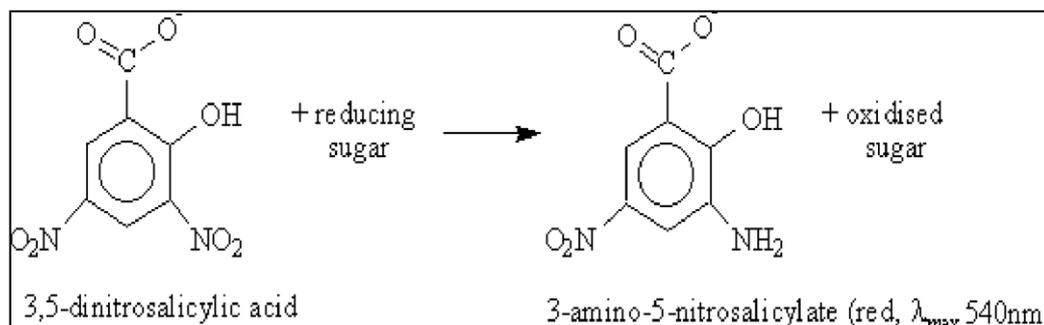


Figure 30. Réaction de réduction de DNS.

7.2.3. Dosage du glucose

Le dosage du glucose est réalisé à l'aide de kit enzymatique (Glucose PAPSL Elitech).

7.3. Dosage de l'acide lactique

7.3.1. Méthode de Taylor

L'acide lactique présent dans le milieu réactionnel est mesuré par la méthode de Taylor (1996) dont le principe repose sur la réaction suivante : l'acide sulfurique concentré provoque à chaud la libération d'acétaldéhyde à partir de l'acide lactique. L'acétaldéhyde réagit avec le cuivre et le p-phénylphénol en donnant un chromogène qui absorbe à 570 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'acide lactique présent dans l'échantillon à doser. Les teneurs sont déterminées en référence à une gamme étalon de lactate pour les concentrations comprises entre 0,01 à 0,17 g/l. Au-delà de cette concentration, une dilution est nécessaire.

7.3.2. Acidité Dornic

L'acidité titrable est exprimée en degré Dornic (D°). Elle est mise en évidence par titration de 1 ml d'échantillon avec une solution d'hydroxyde de sodium N/9 en présence d'un indicateur coloré « la phénolphtaléine » (Figure 31). A partir du nombre de ml de NaOH employé pour atteindre le point de virage et du volume de l'échantillon jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pale, on peut calculer la concentration massique C_a d'acide lactique selon la formule suivante:

$$C_a = \frac{C_b \times V_b \times M_{ac}}{V_a}$$

$$D = C_a/0,1$$

Où

C_b : la concentration d'hydroxyde de sodium

V_b : le volume équivalent, en ml d'hydroxyde de sodium

M_{ac} : la masse molaire de la molécule d'acide lactique

V_a : le volume de l'échantillon

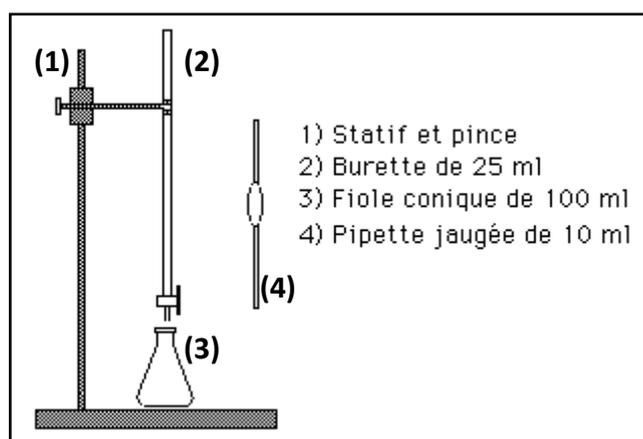


Figure 31. Représentation d'appareillage utilisé pour la titration (<http://www.ulb.ac.be/sciences/cudec/LaitManip2.html>).

7.4. Dosage des protéines

La méthode de Lowry *et al.* (1951) a été utilisée pour déterminer les concentrations totales en protéine du fruit et des cladodes d'*Opuntia ficus indica*. Cette méthode n'est linéaire que pour des concentrations en protéines comprises entre 0,01 et 0,1 g/l. La gamme étalon est réalisée à l'aide d'une solution de BSA (Bovine Sérum Albumine) à 0,2 g/l. Un volume de 1 ml d'échantillon à doser convenablement dilué, est incubé à l'obscurité pendant 10 minutes avec 3 ml de réactif C. Par la suite, 0,3 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué deux fois ont été ajoutés. Le mélange réactionnel est alors rapidement homogénéisé puis incubé pendant 30 minutes à l'obscurité avant de lire l'absorbance à 750 nm.

7.5. Méthodologie de surfaces de réponse (MSR) et analyse statistique

Afin de réduire le nombre d'essais à réaliser et pour améliorer les conditions d'hydrolyse de la matière lignocellulosique et les conditions de fermentation lactique, une méthode des plans d'expériences a été appliquée. C'est le concept de surface de réponse

composite centré qui permet de modéliser une surface de réponse du second degré et de ce fait l'optimisation du procédé à étudié. Cette méthodologie a été appliquée dans ce travail pour:

- l'optimisation des conditions d'hydrolyse de la matière lignocellulosique,
- l'optimisation des conditions de fermentation lactique.

Le modèle statistique composite centré (CCD) a été utilisé afin d'évaluer l'effet de trois facteurs étudiés pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide de la poudre des cladodes d'*Opuntia ficus indica* (Tableau 23): Acide sulfurique (g/l) (X_1), Température °C (X_2), Temps (mn) (X_3). Le Tableau 24 montre les niveaux des facteurs étudiés pour l'optimisation de production d'acide lactique: la concentration des sucres réducteurs du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* (X_1), la concentration d'extrait de levure (X_2) et l'âge d'inoculum (X_3). Pour la procédure d'optimisation, les variables sélectionnées ont été prescrites dans cinq niveaux, codés (-2, -1, 0, 1, 2), ($-\alpha$, -1, 0, +1 et $+\alpha$) les conditions d'hydrolyse et d'optimisation de la production d'acide lactique, respectivement.

Tableau 23. Niveaux des facteurs étudiés par le plan composite centré pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide.

Variables	Codes	Niveaux				
		-2	-1	0	+1	2
Acide sulfurique (%)	X_1	1.5	2.5	3.5	4.5	5.5
Température (C°)	X_2	80	90	100	110	120
Temps (h)	X_3	40	50	60	70	80

Tableau 24. Niveaux des facteurs étudiés par le plan composite centré pour l'optimisation de la production d'acide lactique.

Variables	Codes	Niveaux				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Sucres réducteurs de fruit d'OFI (g/l)	X_1	33,18	40	50	60	66,82
Extrait de levure (g/l)	X_2	6,63	8	10	12	13,36
Age d'inoculum (h)	X_3	4,63	6	8	10	11,36

$\alpha=1,682$

Les tableaux 25 et 26 représentent les matrices expérimentales du modèle pour 20 essais (8 points factoriels, 6 points axiaux, 6 points centraux). Pour prédire le point optimal, la fonction polynomiale de deuxième degré est tracée pour corréler la relation entre les variables indépendants et la réponse.

Les données expérimentales obtenues à partir du modèle composite centré peuvent être représentées selon d'équation suivante:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \text{ (Eq. 1)}$$

Où Y_i est la réponse prédite, X_i et X_j sont les variables indépendants dans le modèle est le nombre de variables indépendantes, β_0 est l'interception entre les constantes et les coefficients de régression du modèle), β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique et β_{ij} est le coefficient d'interaction. L'analyse multivariable de régression par l'équation du modèle (Eq. 1) a été effectuée en utilisant le logiciel statistique MINITAB 16 (Minitab Inc, State College, PA - www.minitab.com) pour obtenir l'équation 2 (Eq. 2) utilisée pour optimiser les réponses de produit.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \text{ (Eq. 2)}$$

Tableau 25. Matrice expérimentale du plan composite centré pour l'optimisation des conditions d'hydrolyse acide.

Expériences	X1	X2	X3
1			
2	0	-2	0
3	1	-1	1
4	-1	1	1
5	1	1	-1
6	0	0	0
7	-1	-1	-1
8	0	0	2
9	-2	0	0
10	2	0	0
11	-1	1	-1
12	0	0	0
13	0	0	-2
14	-1	-1	1
15	0	2	0
16	1	1	1
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

Tableau 26. Matrice expérimentale du plan composite centré pour l'optimisation de la production d'acide lactique.

Expériences	X1	X2	X3
1	1	1	1
2	0	1,682	0
3	1,682	0	0
4	0	0	0
5	1	1	-1
6	0	0	1,682
7	-1	1	1
8	0	0	0
9	-1	1	-1
10	1	-1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	1,682	0
14	1	-1	-1
15	-1	-1	1
16	-1	-1	-1
17	0	0	0
18	0	0	-1,682
19	0	0	0
20	-1,682	0	0

Le logiciel utilisé est disponible sur le site internet JMP (<http://www.jampdiscovery.com>). Ce logiciel est programmé pour calculer des réponses, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt. Cet ensemble de possibilités permet d'effectuer de multiples analyses et de regarder ces données sous tous les angles.

L'analyse statistique du modèle est exécutée en analysant la variance (ANOVA). Cette analyse inclut le test de Fisher, sa probabilité associée $p(F)$, le coefficient de détermination R^2 qui mesure la qualité d'ajustement du modèle de régression. Pour chaque variable, les modèles quadratiques sont représentés par les courbes d'isoréponse et de la surface de réponse (3D).

L'analyse de variance (ANOVA) est un outil essentiel dans la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Le principe de l'analyse de la variance

est basé sur le calcul de l'écart total entre les différences mesures Y_i du plan d'expérience et la moyenne de ces mesures.

La statistique la plus importante dans l'analyse de la variance est la valeur P. Cette valeur peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0,05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0,01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

Le R^2 est donc une mesure de la qualité du modèle qui prend des valeurs comprises entre 0 et 1. S'il est proche de 1, le modèle permet de retrouver les valeurs des réponses mesurées. S'il est égal à 0, le modèle n'explique rien.

L'exploitation du modèle validé est aussi réalisée graphiquement en traçant en trois dimensions (3D) les courbes.

7.6. Calcul des paramètres cinétiques

7.6.1. Vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max})

Au cours de la phase exponentielle ou μ est constante et atteint sa valeur maximale dans les conditions expérimentales données. Elle est alors notée μ_{\max} . Pour la calculer, on détermine donc la pente de la droite correspondant à cette phase en prenant deux points d'abscisse t_1 et t_2 durant cette phase et de coordonnées respectives DO_1 et DO_2 . On obtiendra:

$$\mu_{\max} = (\ln DO_2 - \ln DO_1) / (t_2 - t_1)$$

avec :

μ_{\max} : vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})

DO : Densité Optique

7.6.2. Productivité volumique

La productivité volumique est la quantité de produit (acide lactique) par unité de temps et de volume:

$$\delta = [(P-P_0)/ V] * 1/t$$

avec :

δ : productivité volumique (g/l.h)

t : durée de la fermentation (h)

V : volume du milieu (l)

P : concentration de produit au temps (t) (g/l)

P₀ : concentration de produit dans le milieu à t = 0 (g/l)

7.6.3. Rendement de bioconversion

Le rendement de bioconversion est défini comme le rapport de métabolite formé (P) par la masse de substrat carboné consommé (S):

Il est calculé par :

$$Y_{P/S} = (P - P_0) / (S_0 - S)$$

avec :

Y_{P/S} : rendement de production de produit à partir du substrat (g/g)

P₀ : concentration de produit dans le milieu à t = 0 (g/l)

S₀ : concentration de substrat dans le milieu à t = 0 (g/l)

TROISIEME PARTIE :
RESULTATS ET DISCUSSION

I. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE SUR JUS DE FRUIT D'*OPUNTIA FICUS INDICA*

Avant de commencer cette étude, nous avons d'abord analysé la composition du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*. Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 27. Ils montrent que le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est composé essentiellement de 82,25% d'eau. Il constitue essentiellement une source de carbone avec 15,2% de sucres totaux et 13,5% de sucres réducteurs. Cependant, il renferme une faible quantité de protéines (0,7%).

Tableau 27. Constituants du fruit cru d'*Opuntia ficus indica*

	Eau (%)	Concentration des protéines (%)	Sucres totaux (%)	Sucres réducteurs (%)	pH (unités)
Fruit d'<i>Opuntia ficus indica</i>	82,25 ± 1,39	0,7 ± 0,05	15,2 ± 0,25	13,5 ± 0,30	5,5 ± 0,07

Nos résultats concordent bien avec ceux obtenus par Gurrieri et *al.* (2000), Abdel-Razek et Hassan, (2011), Jana, (2012) et Dehbi et *al.* (2014).

Par ailleurs, les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont très exigeantes au point de vue nutritionnel. Elles requièrent pour leur croissance non seulement des substrats complexes carbonés et azotés mais aussi des facteurs de croissance et des éléments minéraux (Foucaud et *al.*, 1997; Fitzpatrick et *al.*, 2001; Hébert et *al.*, 2004; John et *al.*, 2007; Hayek et Ibrahim, 2013).

Pour palier cela, il est nécessaire d'enrichir le milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par une source azotée, des sels minéraux et des vitamines.

Dans les milieux de fermentation des bactéries lactiques, l'extrait de levure est la source d'azote la plus couramment employée et souvent la plus efficace pour la croissance (Heriban et *al.*, 1993). Cette source azotée constitue également une source de vitamines et de facteurs de croissance (Adamberg et *al.*, 2003).

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à explorer le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en tant que matière première pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* 19435. Les effets de la concentration initiale des sucres de jus de fruit, de l'extrait de levure et des sels ont été examinés.

1. Production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*

1.1. Effet de la concentration initiale des sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* sur la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435

Afin d'étudier l'effet de la concentration initiale des sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* sur la production d'acide lactique, plusieurs fermentations ont été réalisées. Pour cela, différentes concentrations initiales en sucres totaux du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* ont été testées: 20, 50, 60, 80 et 90 g/l. Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique à différentes concentrations initiales en sucres de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* sont représentées sur la Figure 32 (A, B, C). Afin d'interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés (Tableau 28).

Les résultats obtenus ont montré d'abord que le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 (Figure 32 A,B,C).

L'effet de la concentration initiale des sucres totaux de jus de fruit sur la production et la productivité d'acide lactique est représenté par la Figure 33. Elle montre que la production d'acide lactique et la productivité volumique augmentent avec la concentration initiale des sucres totaux de jus de fruit jusqu'à 80 g/l puis se stabilisent.

Les meilleures performances de fermentation en termes de production d'acide lactique et de productivité volumique sont obtenues avec une concentration initiale de sucres totaux de jus de fruit de 80 g/l. Dans ces conditions, les valeurs de la concentration d'acide lactique et la productivité volumique sont respectivement 12,87 g/l et 0,20 g/l.h. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues avec 20, 50 et 60 g/l de sucres totaux de jus de fruit (Tableau 28).

Cependant, les résultats obtenus en termes de production d'acide lactique, de productivité volumique et de rendement de production avec une concentration initiale des sucres totaux de 90 g/l sont similaires à ceux obtenus avec une concentration initiale de sucres totaux de 80 g/l de sucres (Tableau 28).

Pour cela, une concentration optimale de 80 g/l de sucres totaux de jus de fruit a été retenue pour la suite des expériences.

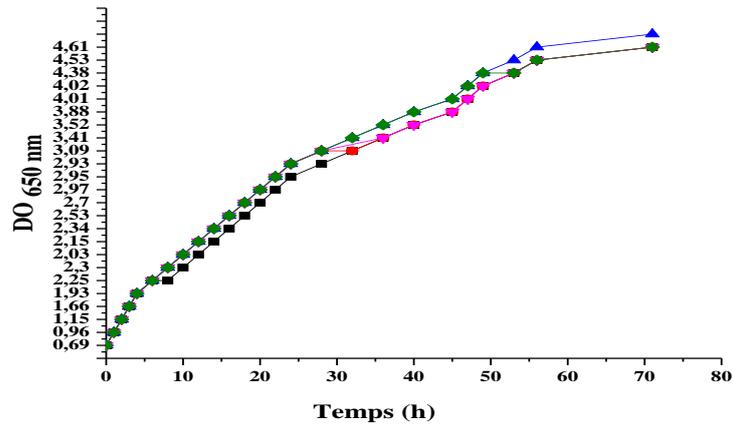
Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Akerberg *et al.* (1998). Ces auteurs ont montré que la production maximale d'acide lactique par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* est obtenue avec 80 g/l de glucose.

Djukić-Vuković *et al.* (2013) ont étudié la production d'acide lactique sur la vinasse de distillerie par *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Ils ont montré que la production d'acide lactique maximale (75,06 g/l) est obtenue avec une concentration initiale de sucre de 85 g/l. Cependant, le rendement (88%) et la productivité (1,29 g/l.h) obtenus sont plus faibles que ceux obtenus avec 55 g/l de sucres, soit un rendement de 92,3% et une productivité de 1,49 g/l.

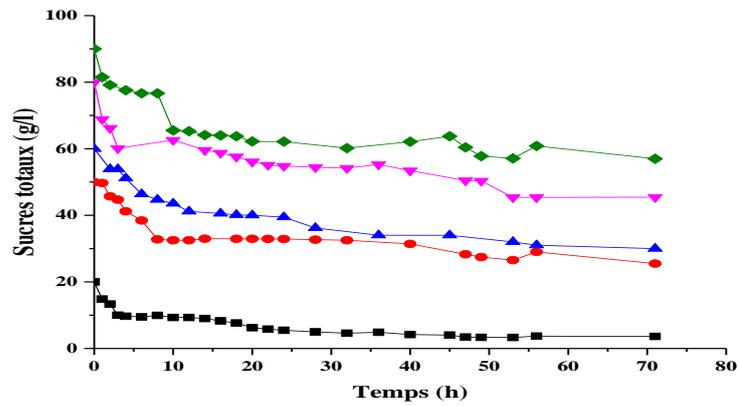
Bai *et al.* (2003) ont étudié l'effet de la concentration initiale en sucre sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus lactis* et ont montré que la productivité maximale de l'acide lactique est obtenue avec 30 g/l de sucre. Au delà de cette concentration, une diminution de la productivité a été observée.

Taleghani *et al.* (2014) ont étudié l'effet de la concentration initiale du lactose sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 8001). Ils ont montré que la production maximale d'acide lactique (32,1 g/l) est obtenue avec 90 g/l de lactose. Le rendement de production est de 44,1%. A des concentrations élevées en lactose, la concentration de production d'acide lactique et le rendement de production d'acide lactique ont diminué. Ceci est dû probablement à l'inhibition par les fortes concentrations en substrat et en produit. En effet, une concentration élevée de lactose de 120 g/l entraîne une diminution de la production d'acide lactique de 14,9 g/l ce qui confirme l'inhibition par excès de substrat.

(A)



(B)



(C)

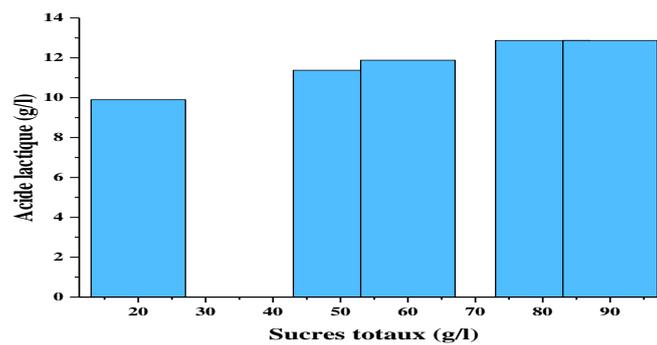


Figure 32 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 à différentes concentrations initiales en sucres totaux du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

(A) : croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435, (B) : consommation des sucres, (C) : production d'acide lactique.

Concentrations initiales des sucres totaux du jus de fruit d'*OFI*: (■): 20 g/l; (●): 50 g/l, (▲): 60 g/l, (▼): 80 g/l, (◆): 90 g/l

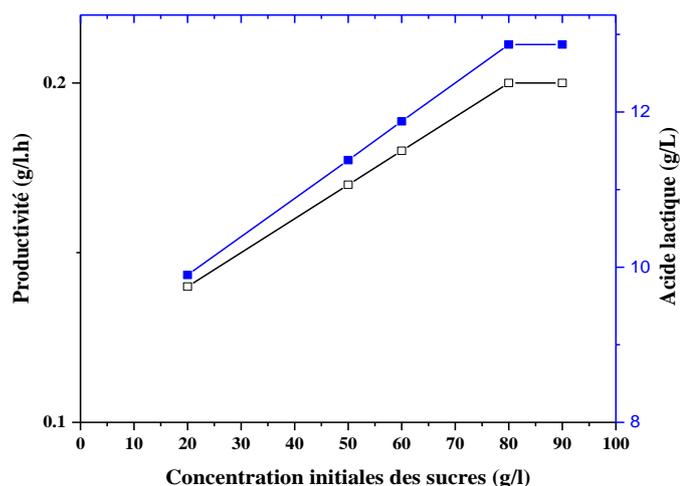


Figure 33. Effet de la concentration initiale des sucres totaux d'*Opuntia ficus indica* sur la production et la productivité de l'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435. (■): acide lactique, (□): productivité volumique

Tableau 28. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 à différentes concentrations initiales en sucres totaux du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

Paramètres	Concentrations initiales des sucres totaux de jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i>				
	(20 g/l)	(50 g/l)	(60 g/l)	(80 g/l)	(90 g/l)
Lactate max (g/l)	9,9	11,38	11,88	12,87	12,87
Rendement Yp/s (%)	48,33	38,36	38,10	31,51	33
Productivité volumique (g/l.h)	0,14	0,17	0,18	0,20	0,20
Taux de croissance max μ_{max} (h⁻¹)	0,32	0,30	0,37	0,25	0,25
Taux de consommation des sucres (%)	81,95	49	43,33	43,2	36,55

1.2. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435

Les expériences précédentes ont montré que le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435. Ces expériences ont montré également qu'il existe une concentration optimale de sucres totaux du jus de fruit de 80 g/l. Cependant, le jus de fruit seul en tant que source de carbone n'est pas suffisant pour la croissance et la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435. Dans le cas d'utilisation dans de tels procédés, il est nécessaire d'enrichir le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* avec d'autres éléments nutritifs.

C'est pour cela, nous avons essayé d'étudier dans cette partie l'effet de l'ajout de l'extrait de levure et les sels dans un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* sur la production d'acide à partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435.

Dans ce travail, cinq sels connus pour leur effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 ont été retenus: $MgSO_4$, $MnSO_4$, CH_3COONa , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 .

L'extrait de levure a été utilisé en tant que source d'azote pour la production d'acide lactique. Pour toutes les fermentations, la concentration initiale des sucres totaux du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* utilisée est de 80 g/l.

Plusieurs fermentations de cultures discontinues ont été réalisées sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435:

- des fermentations sur jus de fruit seul,
- des fermentations sur jus de fruit supplémenté par les sels,
- des fermentations sur jus de fruit supplémenté par les sels et 5 g/l d'extrait de levure.

Les résultats obtenus sont représentés par les Figures 34 et 35. Afin d'interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Ces résultats sont illustrés dans le Tableau 29.

Les résultats obtenus ont montré que l'ajout des sels au milieu de culture à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 17,40% par rapport au jus de fruit seul. En effet, l'enrichissement du milieu de culture en sels a permis

une production d'acide lactique de 15,11 g/l supérieure à celle obtenue sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* seul, soit 12,87 g/l (Tableau 29).

De plus, l'ajout de l'extrait de levure à une concentration de 5 g/l au milieu de culture a permis également d'améliorer la production d'acide lactique. En effet, la concentration maximale en acide lactique obtenue est de 19,8 g/l. Elle est nettement supérieure à celle obtenue sur jus de fruit seul et sur jus de fruit supplémenté par les sels, soit 12,87 g/l et 15,11 g/l, respectivement (Tableau 29).

Finalement, les meilleures performances en termes de production d'acide lactique (19,8 g/l), de productivité (0,33 g/l.h), de rendement $Y_{P/S}$ (47,52%), de vitesse spécifique maximale de croissance (0,32 h⁻¹) et de consommation des sucres (46,87%) ont été obtenues sur jus de fruit enrichi par les sels et par l'extrait de levure (Tableau 29).

En conclusion, on peut dire le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* peut être utilisé par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 pour la production d'acide lactique. La concentration optimale des sucres totaux du jus de fruit est de 80 g/l. L'enrichissement du milieu en sels et en extrait de levure a permis d'améliorer les performances de production d'acide lactique. La concentration maximale en acide lactique obtenue est de 19,8 g/l.

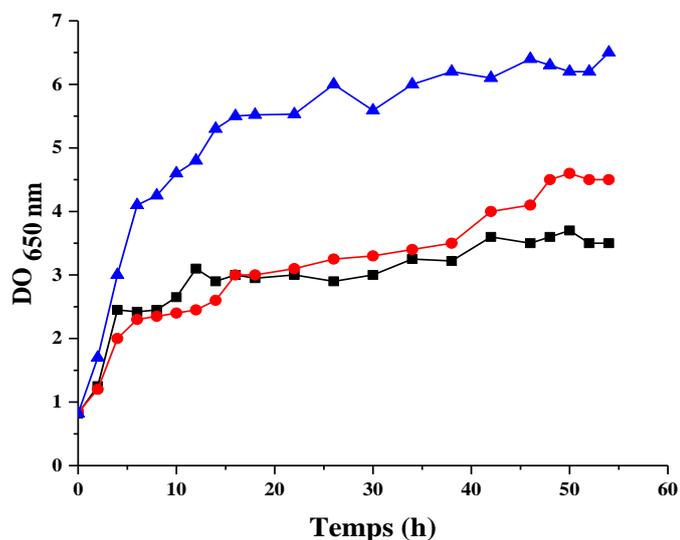


Figure 34. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur les cinétiques de croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435

(■): jus de fruit seul, (●): jus de fruit + les sels, (▲): jus de fruit + les sels + l'extrait de levure.

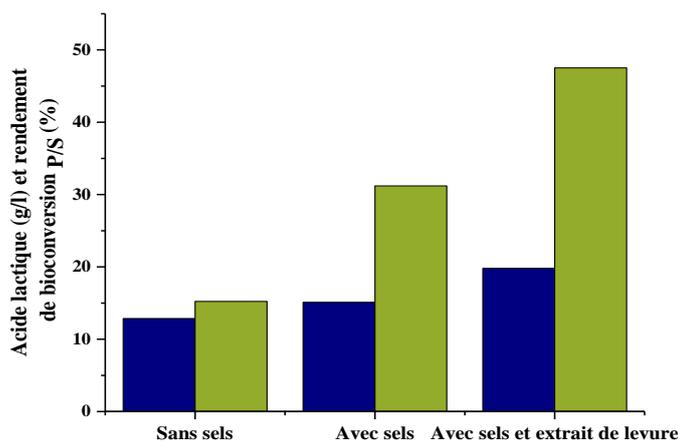


Figure 35. Effet de l'ajout des sels et de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique et le taux de consommation des sucres après 53 h de culture par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435.

(■): acide lactique, (■): rendement $Y_{P/S}$

Tableau 29. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 sur (jus de fruit seul), (jus de fruit + les sels) et (jus de fruit + les sels + l'extrait de levure).

Paramètres	Milieux de culture		
	Jus de fruit d' <i>OFI</i> seul	Jus de fruit d' <i>OFI</i> + les sels	Jus de fruit d' <i>OFI</i> + les sels + l'extrait de levure
Lactate max (g/l)	12,87	15,11	19,8
Rendement $Y_{p/s}$ (%)	31,51	31,20	47,52
Productivité volumique (g/l.h)	0,20	0,24	0,33
Taux de croissance max μ_{max} (h^{-1})	0,25	0,29	0,32
Taux de consommation des sucres (%)	43,2	43,62	46,87

2. Production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) isolée à partir du lait de chamelle sur jus de fruit d'*OFI*

Dans cette partie de travail, nous nous sommes intéressés à étudier les performances d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) isolée à partir de lait de chamelle sur milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* pour la production d'acide lactique.

Afin d'optimiser les paramètres qui affectent la production d'acide lactique sur le milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20), un modèle composite centré a été appliqué.

2.1. Effet de l'ajout des sels sur la croissance et la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Plusieurs fermentations en cultures discontinues ont été réalisées sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20):

- des fermentations sur jus de fruit seul,
- des fermentations sur jus de fruit supplémenté par les sels ($MgSO_4$, $MnSO_4$, CH_3COONa , K_2HPO_4 , KH_2PO_4),

Pour toutes les fermentations, la concentration initiale des sucres réducteurs du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* utilisée est de 50 g/l (concentration optimale).

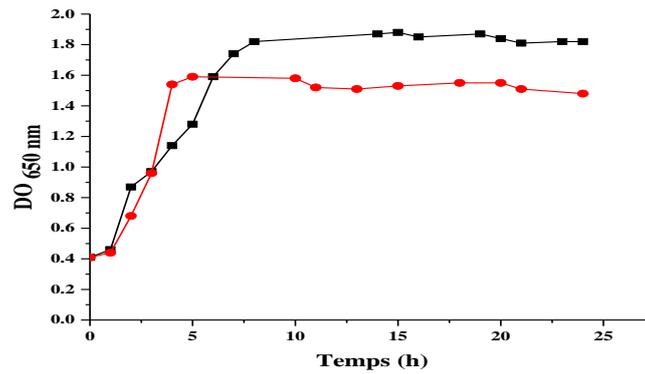
Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres totaux et de production d'acide lactique lors des cultures discontinues sont représentées sur la Figure 36 (A,B,C).

Cette figure montre que l'ajout des sels au milieu de culture a permis une amélioration de la croissance, de la consommation des sucres et de la production d'acide lactique. Pour mieux interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés. Ils sont regroupés dans le Tableau 30.

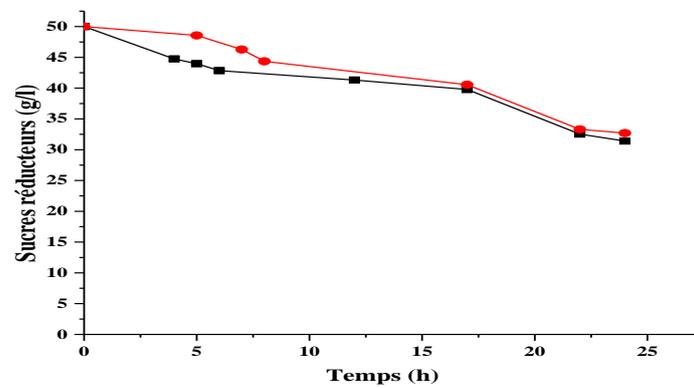
Il ressort de ces résultats que les meilleures performances de fermentation sont obtenues sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par les sels. En effet, les valeurs de la productivité volumique, du rendement de production d'acide lactique, de la concentration maximale en acide lactique sont respectivement, 0,39 g/l.h, 51,45% et 11,86 g/l. Ces valeurs sont nettement supérieures à celles obtenues sur jus de fruit seul et représentent respectivement, 0,32 g/l.h, 34,6% et 10,10 g/l (Tableau 30).

Les exigences en minéraux pour la croissance des bactéries lactiques ne sont pas à négliger. Beaucoup de minéraux stimulent le métabolisme. Ils interviennent comme activateurs d'un grand nombre de réactions enzymatiques du métabolisme des bactéries lactiques (Foucaud et *al.*, 1997). Les lactocoques n'échappent pas la règle. En effet, nous avons montré que l'ajout des minéraux a stimulé la croissance et la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20). L'enrichissement du milieu de culture à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par les sels a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 17,42% par rapport au jus de fruit seul. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Nancib et *al.* (2001, 2005).

(A)



(B)



(C)

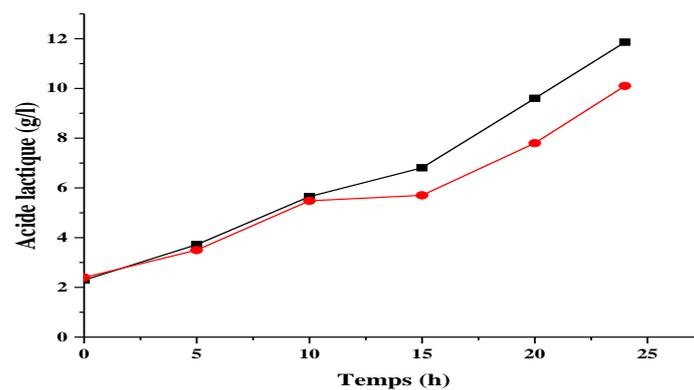


Figure 36 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* seul ou supplémenté avec les sels.

(A) : croissance de *Lactococcus lactis*, (B) : consommation des sucres, (C) : production d'acide lactique

Symboles: (■) : Jus de fruit + sels, (●) : Jus de fruit seul

Tableau 30. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* seul ou supplémenté avec les sels

Milieux de culture	Lactate max (g/l)	Rendement Yp/s (%)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance μ_{\max} (h ⁻¹)	Taux de consommation des sucres (%)
Jus de fruit d' <i>OFI</i> + les sels	11,86	51,45	0,39	0,24	37,2
Jus de fruit d' <i>OFI</i> seul	10,10	44,5	0,32	0,40	34,6

2.2. Optimisation de la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*

Afin d'optimiser le milieu de fermentation à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*, nous avons utilisé le modèle composite centré. Ce modèle nous permettra l'identification des facteurs effectifs, l'étude de leurs interactions et la sélection des conditions optimales pour une production maximale d'acide lactique.

Dans notre travail, nous avons décidé de prendre en compte trois facteurs potentiellement influents sur la production d'acide lactique. Les facteurs sélectionnés sont les suivants: la concentration des sucres réducteurs du jus de fruit (X_1), la concentration d'extrait de levure (X_2) et l'âge d'inoculum (X_3). Ces variables sont prescrits en cinq niveaux et codés par : - α , - 1, 0, +1, + α (Tableau 31).

Les données expérimentales obtenues à partir du modèle composite centré peuvent être représentées par l'équation suivante:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{ij} X_i X_j$$

Avec :

Y_i : réponse simulée

X_i et X_j : formes codées des variables

β_0 : constante du modèle

β_i : coefficient linéaire

β_{ii} : coefficient quadratique

β_{ij} : coefficient d'interaction

Le traitement des données a été effectué par régression linéaire multiple à l'aide du logiciel Minitab 16. L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression est la suivante:

$$Y (g/l) = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{22}X_2X_3$$

Le logiciel utilisé est programmé pour calculer des réponses, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer des courbes, pour construire les surfaces de réponses et pour déterminer les zones d'intérêt.

Tableau 31: Niveaux des facteurs sélectionnés

Variables	Codes	Niveaux				
		- α	-1	0	+1	+ α
SRJF (g/l)	X_1	33,18	40	50	60	66,82
EL (g/l)	X_2	6,63	8	10	12	13,36
AI (h)	X_3	4,63	6	8	10	11,36

$\alpha = 1,682$

SRJF: Sucres Réducteurs du Jus de Fruit, EL: Extrait de Levure, AI: Age de l'Inoculum

2.2.1. Optimisation des conditions de culture

Vingt expériences basées sur le modèle composite centré ont été réalisées avec différentes combinaisons des variables. Les valeurs simulées de l'acide lactique obtenues à partir du modèle composite centré et celles mesurées sont représentées dans le Tableau 32. La concentration maximale d'acide lactique est observée à l'expérience 17 et la concentration minimale est observée à l'expérience 9.

L'expression mathématique caractérisant l'équation de régression est la suivante:

$$Y (g/l) = 29,98 + 2,01X_1 + 1,16X_2 + 2,56X_3 - 2X_1^2 - 2,29X_2^2 - 1,8X_3^2 + 0,19X_1X_2 + 1,39X_1X_3 + 1,53X_2X_3$$

La pertinence du modèle a été vérifiée par les coefficients de détermination (R^2 et R^2 ajusté). Les valeurs du coefficient de détermination (R^2) et le coefficient de détermination ajusté (R^2 ajusté) qui mesurent la qualité du modèle ont été calculées. Ces valeurs représentent 0,91 et 0,82, respectivement.

Ceci suggère que 91% de la variance est attribuée aux variables, montrant ainsi la grande qualité du modèle, ou seulement 9% des variations totales ne peuvent pas être expliquées par le modèle.

Les concentrations d'acide lactique mesurées varient de 19,49 à 32,42 g/l et les valeurs estimées correspondantes varient de 20,13 à 29,98 g/l (Tableau 32).

Le graphique de comparaison de réponses mesurées et estimées est représenté par la Figure 37. Plus les points du graphique sont proche de la première bissectrice, plus le modèle rend assez bien compte des réponses. Le diagramme des réponses estimées, en fonction des réponses mesurées, montre une forte corrélation entre celles-ci (Figure 37). Le modèle rend, donc, bien compte du phénomène étudié.

Ces résultats peuvent être également représentés par le diagramme de Pareto (Figure 38). Ce diagramme a été utilisé pour une meilleure visualisation des principaux effets et d'interaction des facteurs sur la production d'acide lactique. Il montre que l'âge de l'inoculum (X_3) a un impact positif le plus élevé sur le procédé de la fermentation suivi dans un ordre décroissant par la concentration des sucres réducteur (X_1), l'effet d'interaction entre la concentration d'extrait de levure et l'âge d'inoculum (X_2X_3), l'effet d'interaction entre la concentration des sucres réducteurs et l'âge d'inoculum (X_1X_3), l'effet d'interaction entre la concentration des sucres réducteurs et la concentration d'extrait de levure (X_1X_2). Tant que l'extrait de levure a un impact positif faible sur la concentration d'acide lactique, son effet quadratique (X_2^2) a l'impact négatif le plus élevé sur le procédé de fermentation, suivi par l'effet quadratique négatif de la concentration des sucres réducteurs (X_1^2) et l'âge d'inoculum (X_3^2).

Les résultats de l'analyse de la variance sont résumés dans le Tableau 33. La statistique la plus importante de l'analyse de la variance est la valeur de P . Cette valeur peut prendre des valeurs comprises entre 0 et 1. Si elle est inférieure à 0,05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0,01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif. Ces résultats indiquent une valeur de F de 10,87 avec une valeur de P du modèle de 0. De plus, la probabilité d'inadéquation systématique de l'ajustement est de 0,447 ce qui implique que la variance due au manque d'ajustement est non significative.

A partir des valeurs de P de chaque terme du modèle (Tableau 33), on peut conclure que les coefficients quadratiques (X_1^2 , X_2^2 et X_3^2) et les coefficients linéaires (X_1 et X_3) sont les coefficients les plus significatifs ($P < 0,01$).

L'exploitation du modèle validé a été aussi réalisée graphiquement en traçant en trois dimensions (3D) les courbes de surfaces de réponses (Figure 39 A,B,C). L'effet de la concentration des sucres réducteurs de jus fruit et la concentration d'extrait de levure sur la production d'acide lactique est représenté sur la Figure 39 (A). L'âge de l'inoculum de 8 heures est maintenu constant. Les résultats obtenus montrent que la production d'acide lactique augmente avec les sucres réducteurs et l'extrait de levure jusqu'au point optimum (proche du niveau central). Au delà du point optimum, la production d'acide lactique diminue.

L'effet des sucres réducteurs et l'âge d'inoculum sur la production d'acide lactique est représenté sur la Figure 39 (B). Les résultats montrent que le maximum de production d'acide lactique est localisé entre 45 et 50 g/l pour les sucres réducteurs et entre 6 à 6,8 heures pour l'âge d'inoculum.

La Figure 39 (C) montre l'effet de la concentration d'extrait de levure et l'âge d'inoculum sur la production d'acide lactique. Les résultats obtenus montrent que la production d'acide lactique est favorisée par un âge d'inoculum élevé et à des concentrations d'extrait de levure proches du niveau central.

Le même comportement a été observé par Panesar et *al.* (2010). Ils ont montré que l'augmentation de la production d'acide lactique a été observée lorsque on utilise une culture bactérienne de *Lactobacillus casei* âgée de 16 à 20 heures.

D'après les résultats du modèle (Tableau 34, expériences 1, 6, 14 et la moyenne de 6 expériences des points centraux) on peut noter que l'âge d'inoculum est un facteur important qui influence la production d'acide lactique.

2.2.2. Validation du modèle

Les résultats de l'optimisation sont confirmés par une fermentation contenant les facteurs sélectionnés aux valeurs optimales déterminées par le modèle composite centré: une concentration de sucres réducteurs de 60 g/l, une concentration d'extrait de levure de 11 g/l et un âge d'inoculum de 10 heures.

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées par la Figure 40.

Les résultats obtenus montrent que le taux de consommation des sucres est de 96% et la productivité est égale 0,74 g/l.h.

Une concentration d'acide lactique de 32,5 g/l est obtenue avec les conditions optimales simulées par le modèle composite centré. Ce test montre que la concentration mesurée est très proche de celle estimée par le modèle composite centré, soit 33 g/l.

Ceci montre une bonne corrélation entre la concentration d'acide lactique mesurée et celle simulée par le modèle. Ces résultats confirment la validité du modèle composite centré et montrent que l'équation du modèle est satisfaisante et fiable.

Ces résultats confirment l'importance du jus de fruit d'*OFI* en tant que source potentielle pour la production d'acide lactique.

Cependant, les résultats obtenus dans les expériences précédentes ont montré que lorsque le milieu non optimisé à base de jus de fruit est utilisé en tant que source de carbone sans ajout d'extrait de levure, la production d'acide lactique est de 11,86 g/l avec un rendement et une productivité volumique de 0,51 g/g et 0,39 g/l.h, respectivement. Ces résultats confirment que l'enrichissement du milieu de culture par l'extrait de levure permet d'améliorer les performances de la production d'acide lactique. En effet, l'analyse de la variance (ANOVA) (Tableau 33) a montré que l'extrait de levure a un effet significatif ($P < 5\%$) sur la production d'acide lactique.

Des résultats similaires ont été obtenus par Serna Cock et Rodriguez de Stouvenal (2006). Ils ont obtenu une concentration maximale d'acide lactique de 35 g/l à partir des mélasses de canne en utilisant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Flores-Albino et al. (2012) ont obtenu une concentration maximale d'acide lactique de 19,5 g/l par *Lactobacillus* sp. B2. Srivasta et al. (2015) ont obtenu une concentration maximale d'acide lactique de 55,89 g/l à partir des mélasses de canne en utilisant *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025. John et al. (2008) ont montré que 40 g/l d'acide lactique est obtenue par *Lactobacillus rhamnosus* B 103 à partir de bagase cassava par *Lactobacillus delbrueckii* génétiquement modifiée. Nancib et al. (2005) ont obtenu 24,8 g/l d'acide lactique. Ces auteurs ont utilisé le jus de datte en tant que source de carbone (50 g/l) de glucose et l'extrait de levure (10 g/l) en tant que source d'azote pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B445. Meziane et al. (2013) ont obtenu une concentration maximale en acide lactique de 15,8 g/l sur les mélasses par *Lactococcus lactis* ssp avec un rendement et une productivité (0,10

g/g et 0,11 g/l.h, respectivement). Comparées à nos résultats (0,96 g/g et 0,74 g/l.h) ces valeurs sont plus faibles.

L'utilisation d'une méthodologie de recherche expérimentale ou plan d'expérience permet de déterminer l'influence de nombreux paramètres. Le plan choisi est un plan de surface de réponse de type composite centré. L'objectif principal est d'optimiser le milieu de culture pour maximiser la production d'acide lactique.

L'optimisation de la production d'acide lactique à l'aide du modèle composite centré confirme l'importance de la présence de la source carbonée (sucres de jus fruit) et de la source azotée (extrait de levure) mais aussi de l'âge de l'inoculum.

Ce modèle a permis de calculer les corrélations de ces trois facteurs ayant un effet significatif et la détermination de leurs optima: une concentration de sucres réducteurs de 60 g/l, une concentration d'extrait de levure de 11 g/l et un âge d'inoculum de 10 heures.

Tableau 32. Matrice expérimentale du modèle composite centré montrant les valeurs réelles ainsi que les valeurs expérimentales et prédites de la concentration en acide lactique.

Expériences	Sucres réducteurs (g/l) X_1	Extrait de levure (g/l) X_2	Age	Concentration d'acide lactique (g/l)	
			d'inoculum (h) X_3	Mesurée	Simulée
1	60	12	10	31,87	32,73
2	50	13,36	8	26,64	25,45
3	66,82	10	8	29,94	27,7
4	50	10	8	31,59	29,98
5	60	12	6	20,04	21,75
6	50	10	11,36	29,39	29,19
7	40	12	10	25,54	25,54
8	50	10	8	29,12	29,98
9	40	12	6	19,49	20,13
10	60	8	10	26,09	26,97
11	50	10	8	28,43	29,98
12	50	10	8	27,74	29,98
13	50	6,63	8	22,52	21,54
14	60	8	6	20,59	22,11
15	40	8	10	20,73	20,54
16	40	8	6	20,59	21,25
17	50	10	8	32,42	29,98
18	50	10	4,63	22,52	20,55
19	50	10	8	30,22	29,98
20	33,18	10	8	20,87	20,93

Tableau 33. ANOVA pour les surfaces de réponse du modèle quadratique obtenu à partir de conceptions expérimentales.

Source	Degré de liberté	La somme des carés	La signification des carés	Valeur de F	La valeur de P ($P > F$)
Modèle	9	349,41	38,82	10,87	0,000
X_1	1	55,35	55,35	15,50	0,003**
X_2	1	18,44	18,44	5,16	0,046*
X_3	1	90,08	90,08	25,23	0,001**
X_1^2	1	39,01	57,68	16,15	0,002**
X_2^2	1	64,99	75,73	21,21	0,001**
X_3^2	1	47,02	47,02	13,17	0,005**
X_1X_2	1	0,29	0,28	0,08	0,782
X_1X_3	1	15,51	15,51	4,34	0,064*
X_2X_3	1	18,72	18,72	5,24	0,045*
Erreur résiduelle	10	35,71	3,57		
Manque d'ajustement	5	18,97	3,79	1,13	0,447
Erreur pure	5	16,74	3,35		
Total	19	385,12			

** Significatif à 1%

* Significatif à 5%

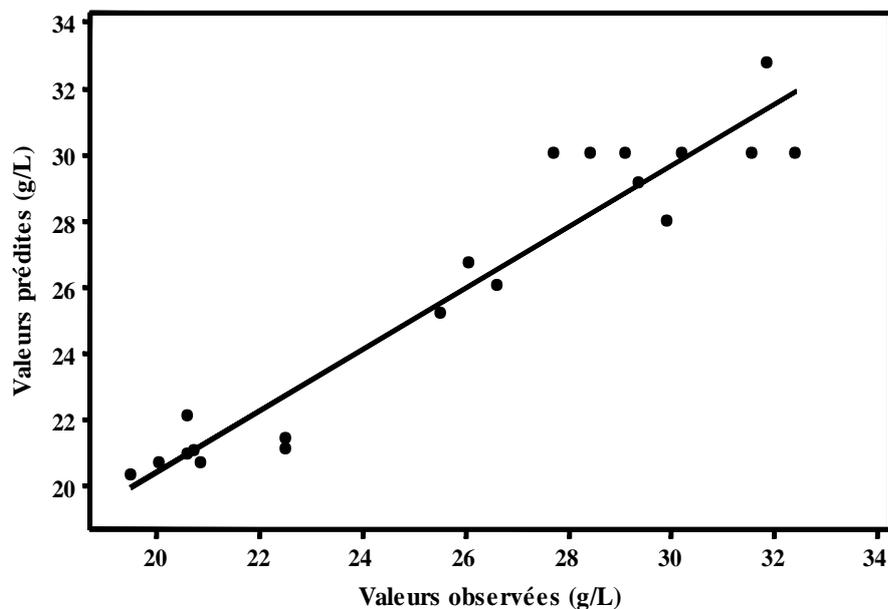


Figure 37. Graphique des valeurs estimées en fonction des valeurs mesurées.

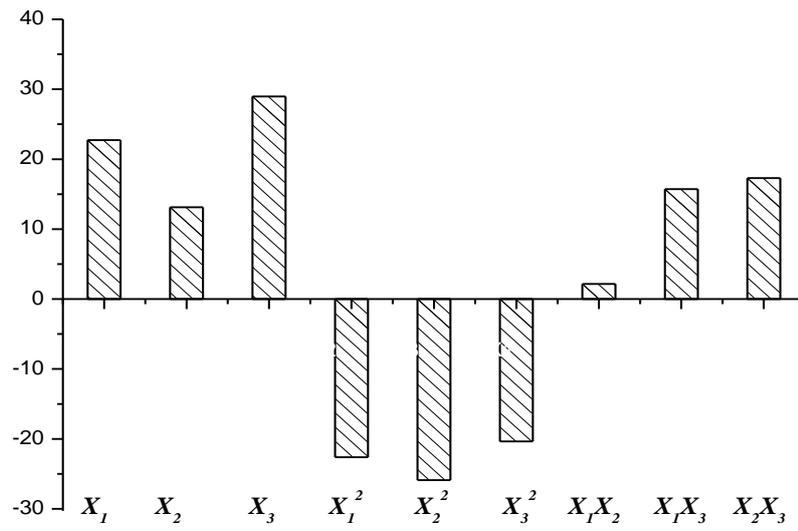


Figure 38. Diagramme de Pareto montrant les effets de différentes variables indépendantes sur la concentration d'acide lactique

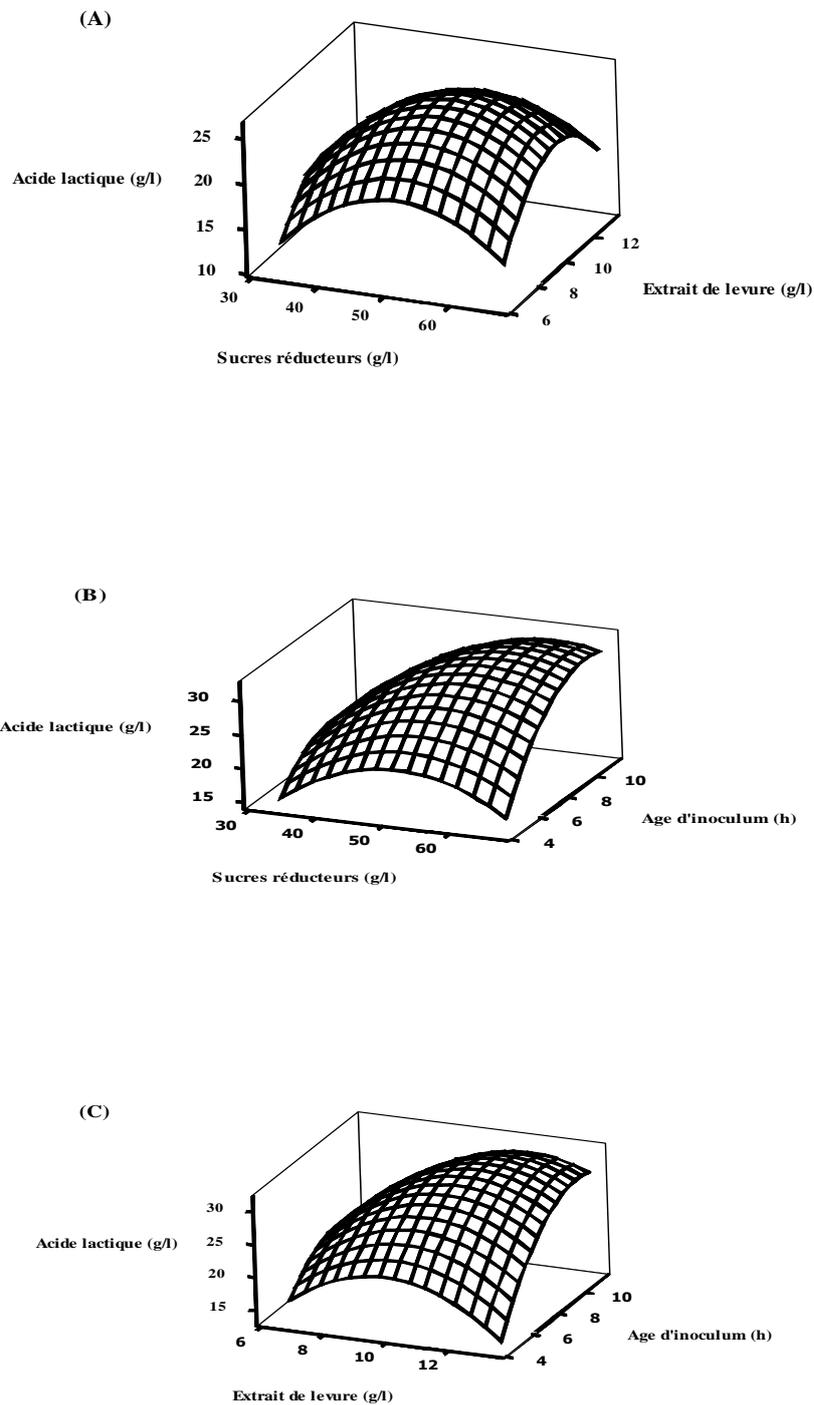


Figure 39 (A,B,C). Courbes de surfaces de réponses (3D) montrant l'effet de différentes variables sur la production d'acide lactique. (A) : effet des sucres réducteurs et de l'extrait de levure, (B) : effet des sucres réducteurs et de l'âge d'inoculum, (C) : effet de l'extrait de levure et de l'âge d'inoculum.

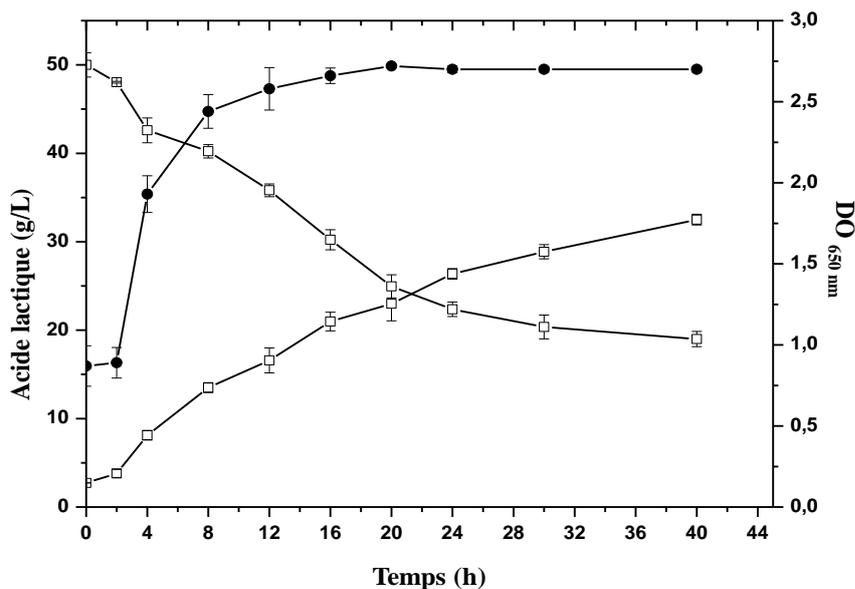


Figure 40. Cinétiques de croissance (●), de consommation des sucres (▲) et de production d'acide lactique (□) par *Lactococcus lactis* sous les conditions optimales (une concentration de sucres réducteurs de 60 g/l, une concentration d'extrait de levure de 11 g/l et un âge d'inoculum de 10 heures).

2.3. Effet de l'ajout de différentes sources azotées sur la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*

La source azotée (co-substrat) d'un milieu de culture constitue une part importante dans le coût de production des métabolites et donc de l'acide lactique. Des études ont montré que la supplémentation du milieu de culture par l'extrait de levure en tant que source azotée représente 38% de coût de milieu (Tejayadi et Cheryan, 1995). L'extrait de levure représente la source d'azote la plus efficace et la plus utilisée dans la majorité des procédés de fermentation. Cependant, ce co-substrat reste relativement coûteux (Yoo et al., 1997).

Il est donc essentiel de trouver un bon équilibre entre les quantités nutritionnelles et technologiques des sources azotées, leur prix et leur disponibilité sur le marché. Plusieurs auteurs ont utilisé d'autres sources azotées moins onéreuses tels que la liqueur de "corn steep", les protéines de l'hydrolysate de blé et le sulfate d'ammonium (Yoo et al., 1997).

L'objectif de cette partie s'incère dans ce cadre précis et consiste à améliorer la production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en testant l'ajout de

différentes sources azotées. Puis tenter de trouver une source azotée efficace et de faible coût pour minimiser le coût lié à l'extrait de levure.

Pour cela, plusieurs sources azotées ont été testées et comparées. Les différentes sources azotées utilisées sont les suivantes : le sulfate d'ammonium, l'urée, la peptone, l'hydrolysate de caséine, la liqueur de "corn steep" et l'extrait de levure. La concentration d'azote totale de chaque source azotée est équivalente à 10 g/l d'extrait de levure. La concentration en acide lactique obtenue après 24 heures a été comparée avec les différentes sources d'azote testées.

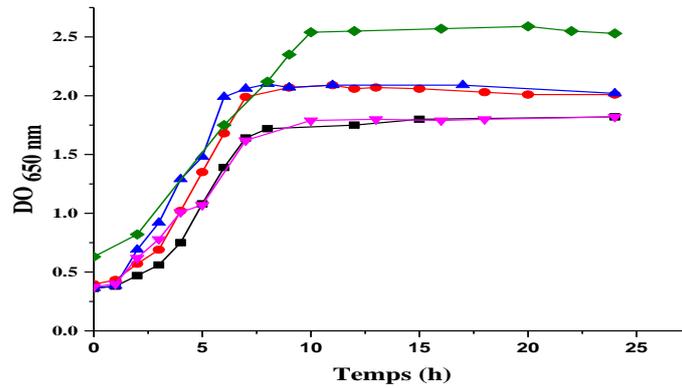
Pour toutes les fermentations, la concentration initiale des sucres réducteurs du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* utilisée est de 50 g/l (concentration optimale).

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées sur la Figure 41 (A,B,C). Afin d'interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés (Tableau 34).

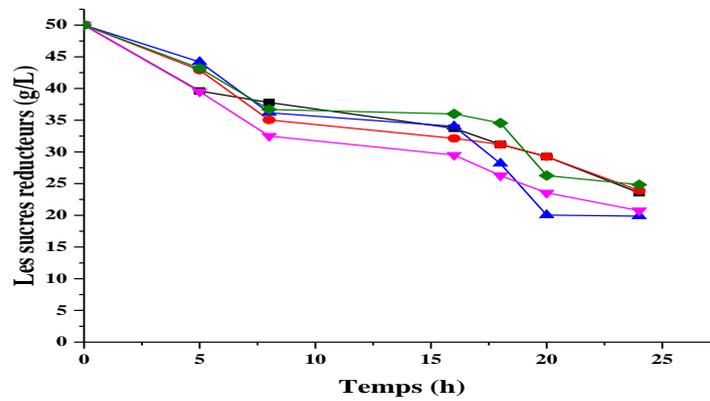
Les résultats obtenus ont montré que les meilleures performances en terme de productivité volumique (1,01 g/l.h) et de production d'acide lactique (27,19 g/l) sont obtenues sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par de l'extrait de levure (Tableau 34).

D'un autre côté, l'hydrolysate de caséine et le sulfate d'ammonium semblent être une bonne alternative pour réduire le coût de l'extrait de levure suivi par la peptone puis l'urée. La concentration d'acide lactique la plus faible a été obtenue avec la liqueur de "corn steep", soit 20,59 g/l (Tableau 34). Par ailleurs, comme le sulfate d'ammonium représente une source d'azote plus compétitive que l'hydrolysate de caséine, ce dernier a été sélectionné pour la suite des essais comme étant une alternative économique pour diminuer au maximum les coûts liés à l'ajout de l'extrait de levure.

(A)



(B)



(C)

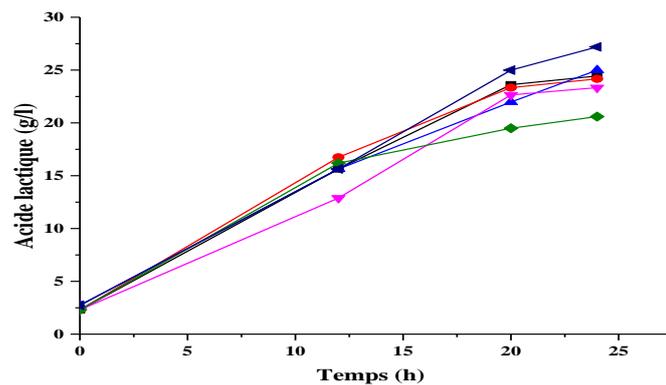


Figure 41 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes sources azotées.

(A): croissance de *Lactococcus lactis*, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique.

(■):Sulfate d'ammonium, (●):peptone, (▲):hydrolysat de caséines, (▼):urée, (◆):liqueur de "corn steep", (◀):extrait de levure.

Tableau 34. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes sources azotées

Paramètres	Jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> supplémenté par différentes sources azotées					
	Extrait de levure	Sulfate d'ammonium	Peptone	Hydrolysat de caséine	Urée	Liqueur de corn steep
Lactate max (g/l)	27,19	24,44	24,17	24,99	23,34	20,59
Rendement Yp/s (%)	79,75	82	82,14	73,85	70,43	71
Productivité volumique (g/l.h)	1,01	0,92	0,91	0,94	0,87	0,76
Taux de croissance max μ_{\max} (h ⁻¹)	0,24	0,25	0,26	0,26	0,23	0,15
Taux de consommation des sucres (%)	59,28	52,9	52,2	60,28	58,52	50,36

La concentration d'azote totale de chaque source azotée est équivalente à 10 g/l d'extrait de levure.

2.4. Effet combiné de sources azotées sur la production d'acide lactique à partir de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (Lc 20)

Afin de minimiser le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure dans le milieu de fermentation, nous avons essayé de substituer partiellement l'extrait de levure par plusieurs combinaisons de deux sources azotées peu coûteuses avec des proportions différentes.

Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par les proportions azotées suivantes :

- (sulfate d'ammonium/extrait de levure) (50/50%),
- (sulfate d'ammonium/extrait de levure) (75/25%),

- (sulfate d'ammonium/urée) (50/50%),
- (sulfate d'ammonium/urée) (25/75%),
- (extrait de levure/urée) (50/50%),
- (extrait de levure/urée) (25/75%),
- (extrait de levure/urée) (75/25%)

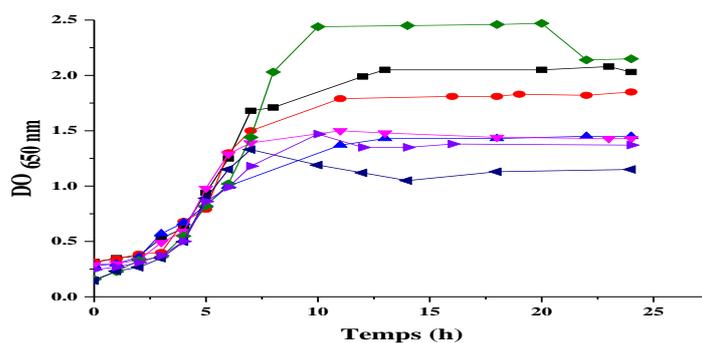
Pour toutes les fermentations, la concentration initiale des sucres réducteurs du jus de fruit d'*Optunia ficus indica* utilisée est de 50 g/l (concentration optimale).

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées par la Figure 42 (A,B,C). Les paramètres cinétiques sont illustrés dans le Tableau 35. D'après les résultats obtenus dans le Tableau 35, l'enrichissement du milieu avec une proportion de 75% d'extrait de levure et de 25% d'urée a permis d'obtenir une production d'acide lactique de 25,13 g/l et une productivité de 0,95 g/l.h.

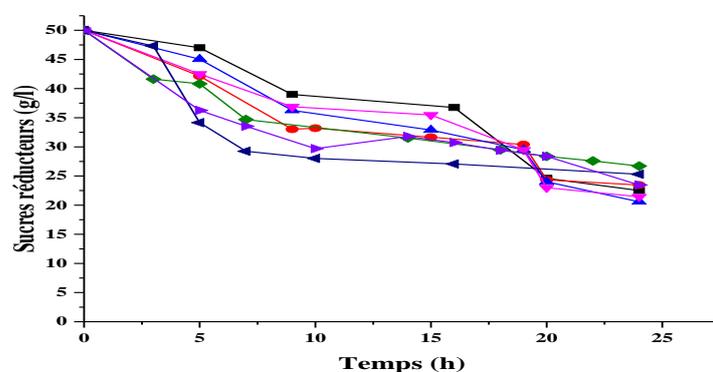
Des valeurs presque similaires ont été obtenues avec 75% de sulfate d'ammonium et 25% d'extrait de levure, soit une production d'acide lactique de 24,99 g/l et une productivité de 0,94 g/l.h.

Cependant, dans l'expérience précédente, nous avons montré que l'ajout du sulfate d'ammonium seul au milieu de culture a permis d'obtenir une production d'acide lactique de 24,44 g/l. Cette concentration est très proche de celle obtenue avec 75% de sulfate d'ammonium et 25 % d'extrait de levure. On peut conclure que le sulfate d'ammonium peut réduire le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure et par conséquent il peut constituer une alternative économique intéressante en tant que co-substrat dans la production d'acide lactique. Cependant, comme l'urée est moins chère que le sulfate d'ammonium, cette source peut être également utilisée en tant que co-substrat intéressant.

(A)



(B)



(C)

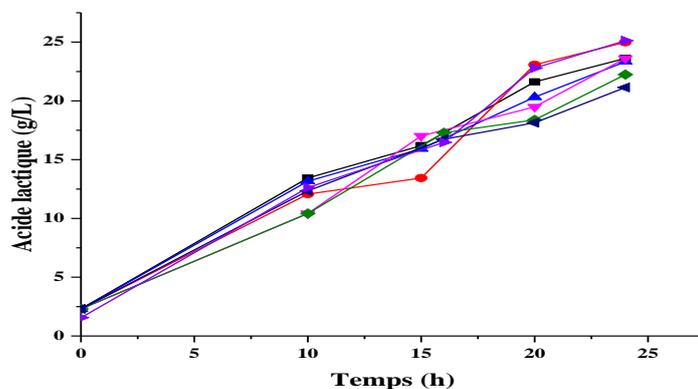


Figure 42 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (Lc 20) sur le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par plusieurs combinaisons de sources azotées à des proportions différentes. (A) : croissance de *Lactococcus lactis* (B) : consommation des sucres, (C) : production d'acide lactique

(■): (sulfate d'ammonium 50%/extrait de levure 50%), (●): (sulfate d'ammonium 75%/extrait de levure 25%), (▲): (sulfate d'ammonium 50%/urée 50%), (▼): (sulfate d'ammonium 25%/urée75%), (◆): (extrait de levure 50%/urée 50%),(◄): (extrait de levure 25%/urée 75%), (►): (extrait de levure 75%/urée 25%)

Tableau 35. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par plusieurs combinaisons de sources azotées à des proportions différentes

Paramètres	Jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> supplémenté par plusieurs combinaisons azotées à des proportions différentes						
	SA/EL (50/50) (%)	SA/EL (75/25) (%)	SA/U (50/50) (%)	SA/U (25/75) (%)	EL/U (50/50) (%)	EL/U (25/75) (%)	EL/U (75/25) (%)
Lactate max (g/l)	23,62	24,99	23,34	23,62	22,24	21,14	25,13
Rendement $Y_{p/s}$ (%)	76	83,87	70,03	73,14	90	79,27	90
Productivité volumique (g/l.h)	0,96	0,94	0,87	0,88	0,83	0,78	0,95
Taux de croissance max μ_{max} (h⁻¹)	0,26	0,26	0,24	0,26	0,31	0,31	0,35
Taux de consommation des sucres (%)	55	53,08	58,86	57,12	46,58	49,4	53,08

(SA) : sulfate d'ammonium, (EL) : extrait de levure et (U) : urée

2.5. Effet de l'ajout des vitamines sur la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*

Les vitamines jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire en tant que coenzyme. Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser des vitamines, d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture. En effet, plusieurs études ont montré que les vitamines du groupe B sont nécessaires pour les bactéries lactiques (Cocaign-Bousquet et *al.*, 1995).

D'après les résultats obtenus dans les expériences précédentes, il a été montré clairement que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace pour la production d'acide lactique par rapport aux autres sources azotées utilisées. Ceci est dû probablement à la présence des vitamines du groupe B dans l'extrait de levure.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons essayé dans cette partie de réduire l'utilisation de l'extrait de levure dans le milieu de fermentation par une substitution partielle ou totale de l'extrait de levure par une source azoté de faible coût (l'urée) et par des vitamines du groupe B: riboflavine (vitamine B2), pantothénate (vitamine B5), nicotinate (vitamine B1), acide p-alinobenzoïque, pyridoxine (vitamine B6) et thiamine (vitamine B1). La quantité de ces vitamines présente dans 10 g/l d'extrait de levure a été calculée (Sunhoon Kwon, 2000) puis supplémentée ensemble avec les sources azotées. La concentration initiale des sucres de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* utilisée est de 50 g/l.

Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées avec différentes combinaisons :

- extrait de levure/urée (50/50%) + les vitamines du groupe B
- extrait de levure/urée (25/75%) + les vitamines du groupe B
- extrait de levure/urée (75/25%) + les vitamines du groupe B
- urée (seule) avec ou sans les vitamines du groupe B

Pour toutes les fermentations, la concentration initiale des sucres réducteurs du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* utilisée est de 50 g/l (concentration optimale).

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées sur la Figure 43 (A,B,C). Les paramètres cinétiques calculés sont illustrés dans le Tableau 36.

Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de vitamines du groupe B au milieu de culture a permis d'améliorer la production d'acide lactique quelque soit la proportion d'extrait de levure et d'urée utilisée (Tableau 36).

Les meilleurs résultats sont obtenus avec une proportion de 75% d'extrait de levure et de 25% d'urée plus les vitamines du groupe B. En effet, les valeurs de la concentration d'acide lactique et de la productivité volumique sont respectivement 26,09 g/l et 1,03 g/l.h. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenus soit avec les autres proportions azotées soit avec l'urée.

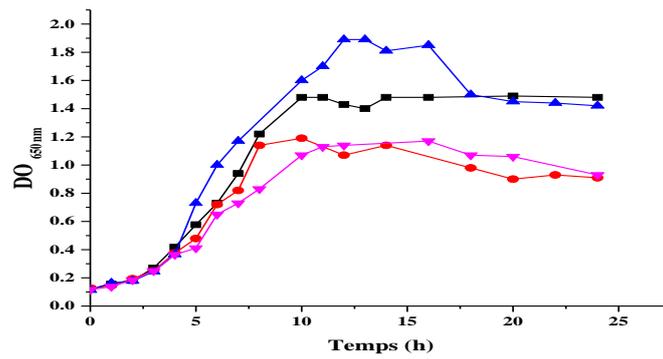
En tenant compte de la quantité des vitamines utilisée dans le milieu de culture, le coût de ces vitamines est négligeable par rapport à celui des sources azotées. Par conséquent, la substitution partielle par une autre source azotée (75% d'extrait de levure, 25% d'urée et des vitamines du groupe B) semble la voie la plus réaliste pour réduire l'apport d'extrait de levure.

Tableau 36. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes proportions azotées (extrait de levure/urée) avec ou sans vitamines du groupe B.

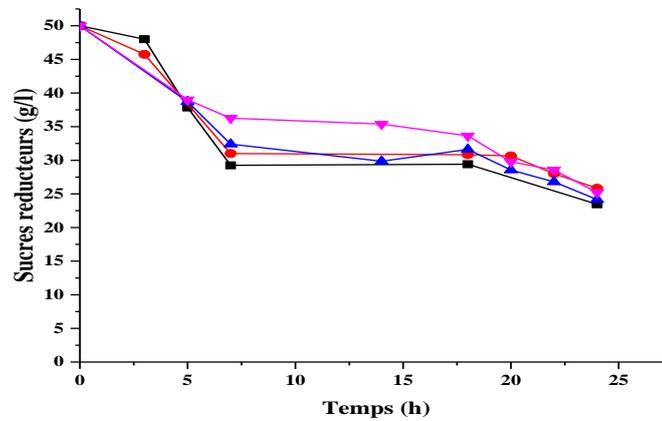
Paramètres	Jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i> supplémenté par plusieurs combinaisons azotées (extrait de levure/urée) avec ou sans vitamines B							
	EL/U (50/50) (%)		EL/U (25/75) (%)		EL/U (75/25) (%)		U (Seule) (%)	
Lactate max (g/l)	Avec Vit.B	Sans Vit.B	Avec Vit.B	Sans Vit.B	Avec Vit.B	Sans Vit.B	Avec Vit.B	Sans Vit.B
		24,72	22,4	22,52	21,14	26,09	25,13	24,99
Amélioration de la production (%)	11,15		6,52		3,82		7,06	

(EL) : extrait de levure, (U) : urée

(A)



(B)



(C)

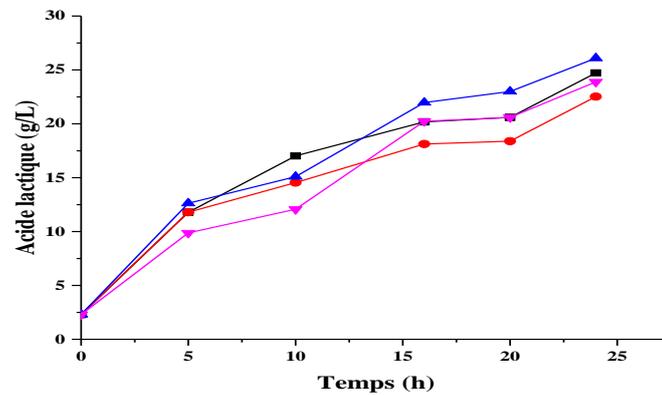


Figure 43 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par différentes proportions azotées (extrait de levure/urée) + des vitamines du groupe B. (A): croissance de *Lactococcus lactis*, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique.

(■): extrait de levure/urée (50/50%) + les vitamines du groupe B, (●): extrait de levure/urée (25/75%) + les vitamines du groupe B, (▲): extrait de levure/urée (75/25%) + les vitamines du groupe B, (▼): urée (seule) + les vitamines du groupe B

II. HYDROLYSE DES CLADODES D'*OPUNTIA FICUS INDICA* (OFI)

1. Hydrolyse acide des cladodes

1.1. Effet de l'acide sulfurique sur l'hydrolyse acide des cladodes

La biomasse lignocellulosique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* contient des sucres polymérisés en cellulose et en hémicellulose. Cette biomasse lignocellulosique peut être utilisée essentiellement en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par les bactéries lactiques. Cependant, cette matière première ne peut être utilisée qu'après une étape de prétraitement mécanique par broyage de la matière lignocellulosique sèche en particules fines suivie par une étape d'hydrolyse en utilisant soit une hydrolyse acide ou bien une hydrolyse enzymatique. L'avantage principal de l'hydrolyse acide est que les acides peuvent pénétrer dans la lignine sans aucun traitement préliminaire de la biomasse lignocellulosique, décomposant ainsi les polymères de la cellulose et de l'hémicellulose pour former des molécules de sucres monomères (Verardi et al., 2012). Plusieurs types d'acides concentrés ou dilués peuvent être utilisés tels que l'acide sulfurique, chlorhydrique, fluorhydrique, phosphorique, nitrique et formique (Galbe et Zacchi, 2002). Les acides sulfuriques et chlorhydriques sont les catalyseurs les plus couramment utilisés pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique (Lenihan et al., 2010).

Dans le cadre de notre travail, l'acide sulfurique a été utilisé pour l'hydrolyse de la poudre des cladodes d'*Opuntia ficus indica* pour la production des sucres monomères. Notre choix a été porté sur l'utilisation de l'acide sulfurique suite à des essais préliminaires effectués sur l'hydrolyse des cladodes soit par l'acide chlorhydrique ou bien l'acide sulfurique. En effet, les résultats obtenus ont montré que l'hydrolyse des cladodes par l'acide sulfurique à 1,5% a donné une concentration en sucres réducteurs de 15 g/l supérieure à celle obtenue par l'acide chlorhydrique à 1,5%, soit une concentration de 11 g/l. Ainsi, l'acide sulfurique a été sélectionné pour l'hydrolyse des cladodes.

2. Optimisation des paramètres de l'hydrolyse acide des cladodes par l'acide sulfurique

2.1. Analyse statistique

L'objectif de cette partie est d'optimiser les conditions d'hydrolyse des cladodes afin d'obtenir la concentration la plus élevée possible en sucres totaux. Pour cela, un modèle

composite centré qui fait appel à la méthodologie de la surface de réponse a été utilisé pour optimiser les conditions expérimentales de l'hydrolyse des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en analysant l'influence de trois facteurs indépendants: la concentration d'acide sulfurique (X_1), le temps de prétraitement (X_2) et la température d'incubation (X_3).

En utilisant le modèle composite centré, les différentes combinaisons de ces variables ont été testées en 20 expériences. Chaque réponse a été modélisée par une équation du second degré, présentée par l'équation suivante:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_i^2 + \beta_{ij} X_i X_j$$

Où Y_i représente la réponse simulée, β_0 est la réponse moyenne (constante du modèle), β_i est le coefficient linéaire, β_{ii} est le coefficient quadratique, β_{ij} est le coefficient d'interaction, et X_i et X_j sont des formes codées des variables indépendantes qui influencent la réponse.

Les valeurs simulées des sucres réducteurs obtenues à partir du modèle composite centré et les valeurs mesurées sont représentées par le Tableau 37.

Le traitement statistique de la matrice est réalisé par le logiciel Minitab 16 pour le calcul des coefficients de régression, l'analyse de la variance (ANOVA), déterminer les valeurs de la probabilité (P), le test de Fisher ainsi que les graphiques de surfaces de réponses. Le traitement des données a été effectué par régression linéaire multiple. La réponse en fonction des facteurs utilisés est exprimée par l'équation du second degré suivante :

$$Y \text{ (g/l)} = 18,23 - 0,46X_1 - 0,48X_2 - 0,08X_3 + 0,01X_1^2 + 0,09X_2^2 - 0,06X_3^2 + 0,19X_1X_2 + 0,56X_1X_3 - 0,23X_2X_3$$

Le Tableau 37 représente les résultats de la réponse (sucres totaux) pour chaque expérience. Ces résultats montrent une variation de la réponse de 16,13 à 22,28 g/l. Ce qui montre la nécessité de l'optimisation des conditions d'hydrolyse des cladodes afin d'atteindre une concentration maximale en sucres totaux. Ces résultats ont montré également qu'il existe une interaction entre la concentration d'acide sulfurique, le temps et la température de prétraitement.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été utilisée pour estimer la signification statistique de chaque facteur et de leur interaction. Les coefficients de régression ainsi que les valeurs de probabilité (P) correspondantes sont données dans le Tableau 38. L'équation de

régression obtenue à partir de l'analyse de la variance ANOVA a montré que la valeur du coefficient de détermination R^2 étant de 14,4%. Cela signifie que seulement 14,4% de la variation de la réponse peut être expliquée par le modèle. Ceci indique une corrélation non satisfaisante entre les valeurs réelles et celles prédites.

Dans tous les cas, la valeur de P du modèle est supérieure à 0,05 indiquant que tous les facteurs n'ont pas d'effet significatif sur la production des sucres totaux. Ceci indique que le modèle n'est pas significatif. On peut dire que les résultats obtenus ne suivent pas le modèle polynomial. Cependant, les coefficients linéaires X_1 , X_2 , X_3 , le coefficient d'interaction $X_2 \times X_3$ et le coefficient quadratique $X_3 \times X_3$ ont un effet négatif. Par contre, les coefficients d'interactions $X_1 \times X_2$, $X_1 \times X_3$ et les coefficients quadratiques $X_1 \times X_1$ et $X_2 \times X_2$ ont un effet positif.

Tableau 37. Matrice expérimentale du modèle composite centré montrant les réponses mesurées et les réponses estimées des sucres totaux.

Expériences	Acide sulfurique (%) (X1)	Température (C°) (X2)	Temps (mn) (X3)	Sucres totaux mesurés (g/l)	Sucres totaux estimés	Variation résiduelle
1	3,5	100	60	18,44	18,23	0,20
2	2,5	90	70	20,52	18,58	1,93
3	3,5	80	60	17,65	18,72	-1,07
4	3,5	120	60	16,62	18,52	-1,90
5	3,5	100	60	17,55	18,23	-0,68
6	1,5	100	60	16,62	19,23	-2,61
7	4,5	90	50	18,31	16,96	1,35
8	3,5	100	40	16,13	18,15	-2,02
9	4,5	110	50	18,75	17,71	1,03
10	3,5	100	80	16,88	17,83	-0,95
11	3,5	100	60	16,50	18,23	-1,73
12	3,5	100	60	17,55	18,23	-0,68
13	4,5	110	70	19,45	18,22	1,23
14	3,5	100	60	18,72	18,23	0,48
15	3,5	100	60	17,65	18,23	-0,58
16	4,5	90	70	18,48	18,39	0,08
17	2,5	110	70	19,26	17,63	1,62
18	2,5	90	50	21,15	19,40	1,74
19	2,5	110	50	22,28	19,38	2,89
20	5,5	100	60	17,00	17,36	-0,36

Tableau 38. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle composite centré.

Variables	Effets	Erreur standard	t-Ratio	P
Constante	18,23	0,83	21,91	0,000
X_1	- 0,46	0,52	- 0,89	0,392
X_2	-0,048	0,52	-0,09	0,927
X_3	- 0,08	0,52	- 0,15	0,881
$X_1 X_2$	0,016	0,41	0,04	0,969
$X_1 X_3$	0,098	0,41	0,23	0,818
$X_2 X_3$	- 0,059	0,41	- 0,14	0,889
$X_1 X_1$	0,19	0,73	0,26	0,799
$X_2 X_2$	0,56	0,73	0,76	0,461
$X_3 X_3$	- 0,23	0,73	- 0,31	0,759

2.2. Optimisation de l'hydrolyse acide des cladodes d'*Opuntia ficus indica*

Afin d'optimiser les conditions optimales d'hydrolyse acide des cladodes d'*Opuntia ficus indica*, les coefficients de régression ont été utilisés sous forme graphique qui constitue une projection de la surface de réponse dans le plan horizontal. Ces graphiques permettent l'interprétation des résultats et ils permettent également de tirer plus rapidement des conclusions et ainsi d'orienter la poursuite de l'étude. La représentation graphique de surface de réponse permet de comprendre l'effet des facteurs sur l'hydrolyse, visualiser leurs interactions réciproques et localiser le niveau optimal de chaque variable pour une réponse maximale.

Les représentations graphiques ont été construites en traçant la réponse sur l'axe Z et les deux variables indépendantes sur les deux axes X et Y en conservant l'autre variable à son niveau optimal. Les courbes de contours (b) et surfaces de réponses (a) montrant l'effet de différentes variables sur l'hydrolyse acide des cladodes sont représentées sur la Figure 44 (A,B,C).

La Figure 44 (A) montre l'effet de la concentration de l'acide sulfurique et la température de prétraitement sur la concentration des sucres totaux. Les résultats obtenus ont montré que durant toutes les températures, la concentration des sucres totaux augmente avec la concentration d'acide. La concentration maximale des sucres totaux est obtenue avec une concentration d'acide sulfurique de 2,5%.

La Figure 44 (B) montre l'effet du temps de prétraitement et la concentration d'acide sulfurique sur la concentration des sucres totaux. On constate que pour toutes les concentrations d'acide sulfurique considérées durant le prétraitement, la concentration des sucres totaux obtenue augmente avec le temps de prétraitement.

L'effet du temps et la température de prétraitement sur la concentration des sucres totaux est représenté sur la Figure 44 (C). On remarque que pour toutes les températures de prétraitement étudiées, la concentration des sucres totaux augmente avec le temps de prétraitement. Une concentration maximale des sucres réducteurs est obtenue après un temps de prétraitement de 50 mn.

La meilleure concentration de sucres totaux (22,28 g/l) est obtenue avec une concentration d'acide sulfurique de 2,5%, une température de prétraitement de 110°C et un temps de prétraitement de 50 mn.

Afin de sélectionner les conditions optimales et leurs gammes respectives, le modèle a été analysé. La réponse maximale de la concentration des sucres totaux simulée par le modèle est égale à 19,38 g/l. Les conditions optimales d'hydrolyse obtenues avec la méthode de surfaces de réponses sont les suivantes: une concentration d'acide sulfurique de 2,9%, une température de prétraitement de 95°C et un temps de prétraitement de 56 mn.

Afin de vérifier la validité du modèle, les conditions optimales déterminées par le modèle composite centré ont été appliquées à l'hydrolyse des cladodes. La concentration des sucres obtenue sous ces conditions est de 25 g/l.

Comme le modèle n'est pas satisfaisant avec un coefficient de détermination (R^2) de 14,4%, on soupçonne une interaction entre l'acide sulfurique et le temps de prétraitement car ils ont un effet positif (Tableau 38). Pour cela, un plan composite centré à deux facteurs (acide sulfurique et temps de prétraitement) a été appliqué. La température a été maintenue constante à 100°C.

L'ajustement du modèle a été vérifié par l'analyse de la variance (ANOVA) (Tableau 39). En utilisant l'analyse de la variance, la signification statistique de l'équation polynomiale de second degré a été évaluée. Les résultats obtenus ont montré que le modèle est significatif avec un coefficient de détermination de 94,82% ($P < 0,05$). Ceci suggère que 94,82% de la variance est attribuée aux variables, montrant ainsi la grande qualité du modèle, ou seulement 5,18% des variations totales ne peuvent pas être expliquées par le modèle. Dans ce cas, les

coefficients linéaires (X_1 , X_2) sont significatifs ($P < 0,05$). Les coefficients quadratiques X_1X_1 et X_2X_2 et le coefficient d'interaction X_1X_2 sont significatifs ($P < 0,05$).

La concentration maximale des sucres réducteurs obtenue est de 40,24 g/l avec une concentration d'acide de 4% et un temps de prétraitement de 92,42 mn.

Les conditions optimales de l'hydrolyse des cladodes estimées par l'équation du modèle sont les suivantes: acide sulfurique à 6,8%, temps de prétraitement de 92,42 mn. Afin de tester la validité du modèle, les conditions optimales obtenues par le modèle ont été appliquées à l'hydrolyse des cladodes. Ce test a montré que la concentration des sucres réducteurs obtenue sous ces conditions est de 40,95 g/l. Cette performance est en accord étroit avec la prédiction du modèle statistique, qui évalue la concentration des sucres réducteurs à 42 g/l. Ces résultats confirment la validité du modèle composite centré.

$$Y (\text{sucres réducteurs g/l}) = 22,54 + 5,85 X_1 + 1,35 X_2 + 0,67 X_1^2 + 6,76 X_2^2 - 1,78 X_1X_2$$

En conclusion, la méthode statistique adoptée dans cette étude représentée par le modèle composite centré a permis d'optimiser les conditions d'hydrolyse des cladodes avec une production maximale de sucres réducteurs. Ce modèle a permis de calculer les corrélations de deux facteurs ayant un effet significatif et la détermination de leurs optima. Les conditions optimales d'hydrolyse des cladodes sont les suivantes : acide sulfurique à 6,8%, temps de prétraitement de 92,42 mn. Dans ces conditions, la concentration maximale des sucres réducteurs obtenue est de 40,95 g/l.

Tableau 39. Analyse de régression des résultats obtenus à partir du modèle composite centré.

Variables	Effet	Erreur standard	t Ratio	P
Constante	22,54	0,98	22,91	0,000
X_1	5,85	0,77	7,52	0,000
X_2	1,35	0,77	1,73	0,126
$X_1.X_2$	-1,78	1,09	-1,69	0,150
X_1^2	0,67	0,83	0,80	0,447
X_2^2	6,76	0,83	8,11	0,000

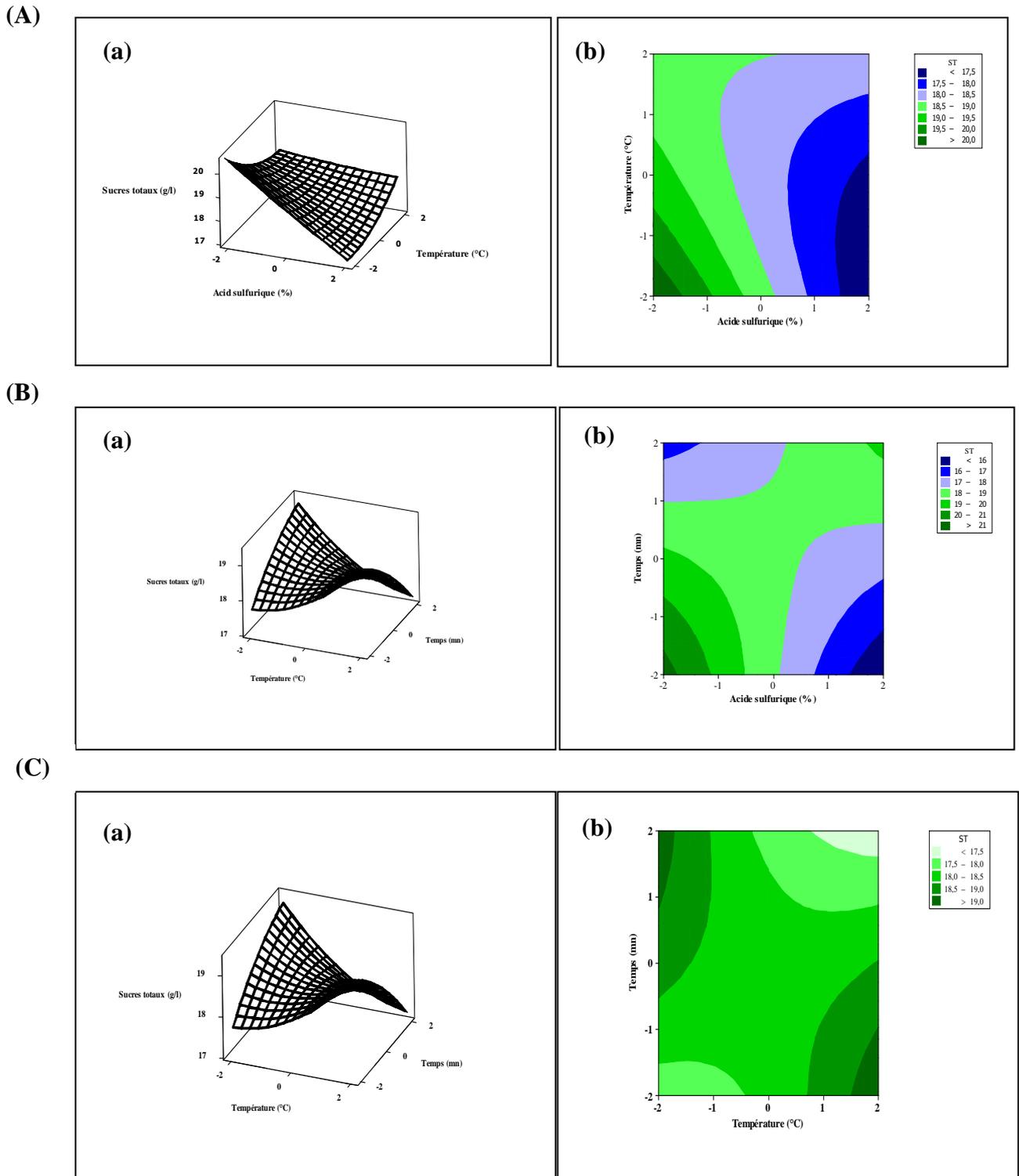


Figure 44 (A, B, C). Courbes de surfaces de réponses (a) et de contours (b) montrant l'effet de différents variables sur l'hydrolyse acide des cladodes d'*OFI* (A): Effet de la concentration d'acide sulfurique et la température de prétraitement sur la concentration des sucres totaux, (B): Effet de la concentration d'acide sulfurique et le temps de prétraitement sur la concentration des sucres totaux, (C): Effet du temps et la température de prétraitement sur la concentration des sucres totaux.

3. Effet de différents types d'hydrolyse des cladodes sur la production des sucres réducteurs

Plusieurs types d'hydrolyse des cladodes ont été testés et comparés. Les conditions de l'hydrolyse des cladodes ont été déjà optimisées :

- une hydrolyse acide: acide sulfurique (6,8%), temps d'incubation (92 mn) et température d'incubation (100°C) (conditions optimales).
- une hydrolyse enzymatique: cellulase (30,5 UI/g), temps d'incubation (20 h), agitation (234 rpm) (conditions optimales).
- une hydrolyse acide suivie par une hydrolyse enzymatique.
- une hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse acide.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 45. Ils montrent que les meilleurs résultats sont obtenus avec une hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse acide. En effet, la concentration maximale des sucres réducteurs obtenue est de 42 g/l. L'hydrolyse enzymatique a donné une concentration de 16 g/l de sucres réducteurs. Les sucres réducteurs récupérés après une hydrolyse acide ou bien par une hydrolyse acide suivie par une hydrolyse enzymatique sont proches avec ceux obtenus avec une hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse acide. Donc, on peut dire que l'hydrolyse acide semble être une alternative économique intéressante comparée aux autres types d'hydrolyse.

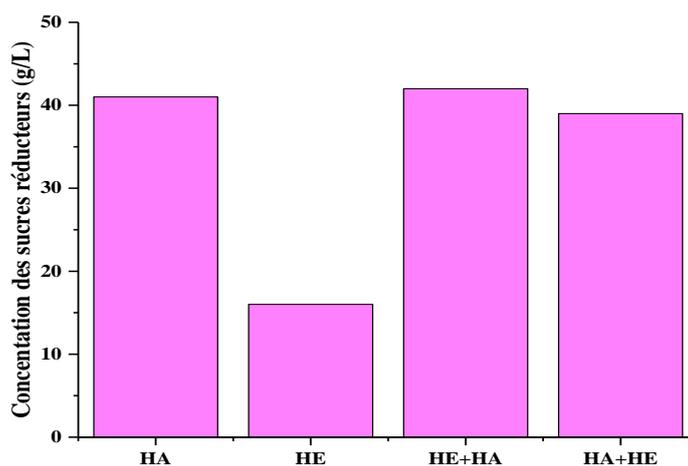


Figure 45. Concentration des sucres réducteurs en fonction de différents types d'hydrolyse. (HA) : hydrolyse acide, (HE): hydrolyse enzymatique, (HE + HA) : hydrolyse enzymatique suivie par une hydrolyse acide, (HA + HE) : hydrolyse acide suivie par une hydrolyse enzymatique.

III. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE SUR HYDROLYSAT DE CLADODES d'*OFI*

Avant d'étudier la production d'acide lactique sur l'hydrolysat des cladodes d'*Opuntia ficus indica*, nous avons analysé les principaux composants des cladodes. Les résultats obtenus de cette analyse montrent que les cladodes d'*Opuntia ficus indica* se composent de 92% d'eau, de 5,12% de protéines, de 8% de sucres totaux et de 3,22 % de sucres réducteurs (Tableau 40).

De ce fait, la biomasse lignocellulosique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* peut constituer une alternative intéressante en tant que matière première pour la production d'acide lactique. D'autant plus, qu'elle est facilement disponible, elle n'as pas une valeur alimentaire compétitive et elle n'est pas chère par rapport à d'autres matières premières tels que l'amidon de maïs ou les sucres.

Tableau 40. Constituants des cladodes d'*Opuntia ficus indica*.

Principaux constituants des cladodes d' <i>OFI</i>	Eau (%)	Protéines (%)	Sucres totaux (%)	Sucres réducteurs (%)	pH
	92 ±1	5,12 ^a ±0,5	8 ^a ±1	3,22 ^a ±0,37	5,13 ±0,06

(^a) :% poids sec

Du fait que *Lactococcus lactis* est incapable d'utiliser directement la lignocellulose, une hydrolyse acide et/ou enzymatique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* est nécessaire pour transformer la biomasse lignocellulosique en sucres fermentescibles.

L'objectif de cette partie de travail est d'évaluer la possibilité d'utiliser l'hydrolysat enzymatique et/ou acide des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

1. Production d'acide lactique sur hydrolysats acides de cladodes d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435

Nous commençons d'abord dans une première partie à utiliser l'hydrolysats acides des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées :

- des fermentations sur un milieu contenant 25 g/l de sucres totaux d'hydrolysats acides des cladodes seul
- des fermentations sur un milieu contenant 25 g/l de sucres totaux d'hydrolysats acides des cladodes supplémenté par des sels,
- des fermentations sur un mélange de 5% d'hydrolysats acides et de 95% de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* contenant 80 g/l de sucres totaux (concentration optimale) supplémenté par des sels.

Les cinétiques de croissance et de production d'acide lactique sont représentées sur les Figures 46 et 47. Les paramètres cinétiques calculés sur les trois milieux sont résumés dans le Tableau 41.

D'après les résultats obtenus dans le Tableau 41, on constate d'abord que l'ajout des sels sur l'hydrolysats acides des cladodes ou bien sur un mélange d'hydrolysats acides des cladodes et du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* a permis d'améliorer tous les paramètres cinétiques de la fermentation par rapport à l'hydrolysats acides des cladodes seul.

Cependant, les meilleures performances de production d'acide lactique après 56 heures de culture ont été obtenues sur un mélange de jus de fruit et d'hydrolysats acides d'*Opuntia ficus indica* avec une proportion de 95% de jus de fruit et 5% d'hydrolysats acides, respectivement. En effet, les valeurs de la concentration en acide lactique, de la productivité volumique, et du taux de consommation des sucres sont respectivement, 13,86 g/l, 0,21 g/l.h et 67,8%.

Finalement, l'ajout des sels sur un milieu à base d'hydrolysats acides a permis l'amélioration de la concentration d'acide lactique de 22,2% par rapport à l'hydrolysats acides seul.

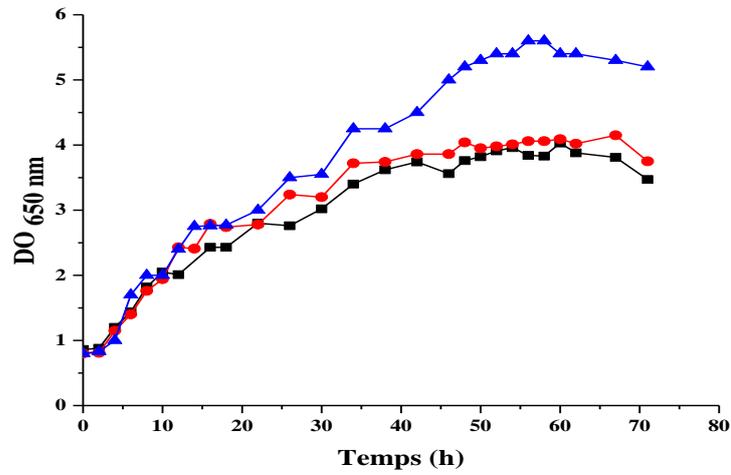


Figure 46. Cinétiques de croissance de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (19435) sur différents milieux de culture à base d'hydrolysats acides.

(■): hydrolysats acides seuls, (●): hydrolysats acides + sels, (▲): hydrolysats acides + jus de fruit + sels)

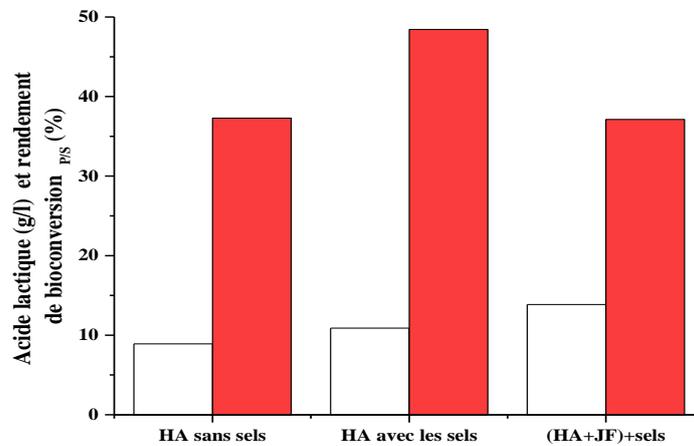


Figure 47. Production de l'acide lactique sur différents milieux de culture à base d'hydrolysats acides.

(□): acide lactique, (■): rendement $Y_{P/S}$

Tableau 41. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 19435 sur différents milieux de culture à base d'hydrolysate acide (hydrolysate acide seul, hydrolysate acide + sels, hydrolysate acide + jus de fruit + sels)

Paramètres	Milieux de culture		
	Hydrolysate acide seul	Hydrolysate acide + sels	(5%) Hydrolysate acide + (95%) jus de fruit + sels
Lactate max (g/l)	8,91	10,89	13,86
Rendement Yp/s (%)	37,29	48,43	37,12
Productivité volumique (g/l.h)	0,12	0,15	0,21
Taux de croissance max μ_{max} (h⁻¹)	0,09	0,11	0,097
Taux de consommation des sucres (%)	66,31	67,36	67,8

2. Production d'acide lactique sur hydrolysate d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

2.1. Effet de différents types d'hydrolyse des cladodes sur la production d'acide lactique

Les résultats obtenus dans les expériences précédentes ont montré que la souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) isolée à partir de lait de chamelle sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est plus performante que celle de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en terme de production d'acide lactique et de temps de fermentation.

A la suite de cela, nous avons essayé, cette fois d'étudier les performances de la souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur un milieu à base d'hydrolysate acide

et/ou enzymatique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en tant que source de carbone. Plusieurs fermentations discontinues ont été réalisées sur différents types d'hydrolysats :

- un hydrolysate acide,
- un hydrolysate enzymatique,
- un hydrolysate acide suivi par une hydrolyse enzymatique,
- un hydrolysate enzymatique suivi par une hydrolyse acide.

La production d'acide lactique et la productivité volumique en fonction du type d'hydrolysate sont représentées par les Figures 48 et 49. Les paramètres cinétiques calculés sur les différents types d'hydrolysats sont résumés dans le Tableau 42.

Les résultats obtenus ont montré d'abord que l'hydrolysate des cladodes peut constituer une matière première potentielle pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20). D'après le Tableau 42, les meilleurs résultats sont obtenus sur un milieu à base d'hydrolysate enzymatique. En effet, les valeurs de la production maximale d'acide lactique, du rendement $Y_{P/S}$, de la productivité volumique et du taux de croissance maximum sont respectivement, 10,17 g/l, 80,48%, 0,23 g/l.h et 0,26 h⁻¹.

Nous avons également constaté que les paramètres cinétiques sur un milieu à base d'hydrolysate enzymatique suivi par une hydrolyse acide ou bien sur un milieu à base d'hydrolysate acide suivi par une hydrolyse enzymatique, n'ont pas été nettement améliorés par rapport à ceux obtenus sur l'hydrolysate acide. Pour cette raison, l'hydrolysate enzymatique et l'hydrolysate acide ont été retenus pour la suite des fermentations.

Par ailleurs, la diminution des performances de production d'acide lactique sur l'hydrolysate acide par rapport à l'hydrolysate enzymatique peut être probablement associée à des facteurs d'inhibition présents dans l'hydrolysate acide. En effet, ce phénomène a été observé par Gutierrez-Rivera et *al.* (2015). Ils ont montré que la présence de certains composés tels que le furfural et l'hydroxyméthylfurfural dans l'hydrolysate acide ont des effets négatifs sur les performances de la fermentation. Palmqvist et *al.* (2000) ont montré que les principaux composés phénoliques de l'hydrolysate acide sont l'acide 4-hydroxybenzoïque, la vanilline et le catéchol. Ces composés sont responsables de la diminution de la vitesse de croissance, du rendement et de la productivité de production d'éthanol. Il a été également montré que d'autres composés issus de la dégradation de la lignine durant l'hydrolyse contribuent au phénomène d'inhibition (Palmqvist et *al.*, 2000).

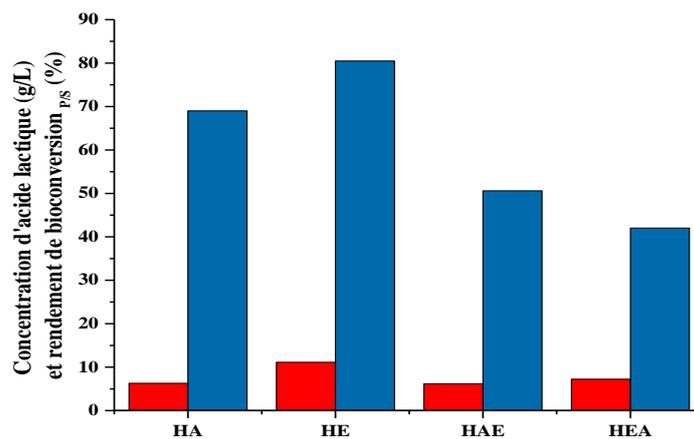


Figure 48. Concentrations d'acide lactique et rendements de bioconversion en fonction de différents types d'hydrolysats de cladodes par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20).

(■): acide lactique, (■): rendement $Y_{P/S}$

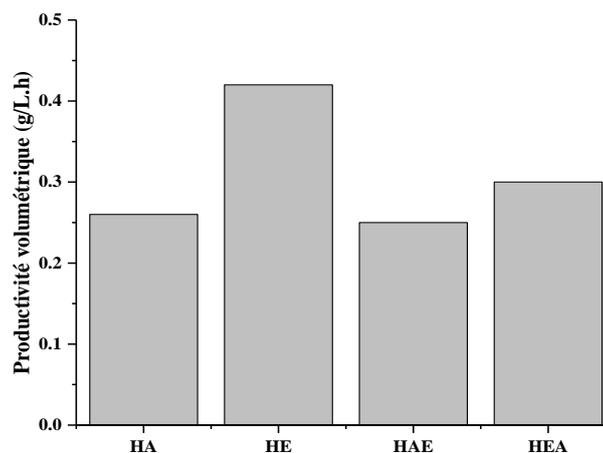


Figure 49. Productivités volumiques de production d'acide lactique en fonction de différents types d'hydrolysats de cladodes par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20).

Tableau 42. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur différents types d'hydrolysats.

Paramètres	Milieux de cultures			
	Hydrolysate acide	Hydrolysate enzymatique	Hydrolysate acide suivi par une hydrolyse enzymatique	Hydrolysate enzymatique suivi par une hydrolyse acide
Lactate max (g/l)	6,29	10,17	6,18	7,24
Rendement $Y_{p/s}$ (%)	69,01	80,48	50,59	42,01
Productivité volumique (g/l.h)	0,22	0,42	0,25	0,3
Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	0,26	0,39	0,23	0,26

2.2. Production d'acide lactique sur l'hydrolysate enzymatique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

2.2.1. Effet de la source azotée sur la production d'acide lactique sur hydrolysate enzymatique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Après avoir déterminé le type d'hydrolysate des cladodes pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20), nous avons essayé d'améliorer les performances de production d'acide lactique par l'ajout de sources azotées dans un milieu à base d'hydrolysate enzymatique des cladodes.

Pour cela, plusieurs sources azotées ont été testées sur un milieu contenant 16 g/l de sucres réducteurs d'hydrolysate enzymatique des cladodes. Les sources azotées utilisées sont les suivantes : l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium et l'urée. La concentration d'azote totale de chaque source azotée est équivalente à 10 g/l d'extrait de levure.

Les cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres sont représentées sur la Figure 50. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout de l'extrait de levure au milieu de culture contenant l'hydrolysate enzymatique a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 32,15%, soit une concentration finale de 13,44 g/l comparée à celle obtenue sur l'hydrolysate enzymatique seul, soit une concentration de 10,17 g/l.

Le sulfate d'ammonium a permis également d'améliorer la production d'acide lactique de 18,68% avec une concentration finale plus faible, soit 12,07 g/l comparée à celle obtenue sur l'hydrolysate enzymatique seule.

Cependant, l'ajout de l'urée a permis une amélioration de la production d'acide lactique de 7,86%, soit une concentration finale de 10,97 g/l proche de celle obtenue sur l'hydrolysate enzymatique seul.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'ajout de l'extrait de levure sur l'hydrolysate enzymatique. En effet, les valeurs de la production d'acide lactique, de la productivité volumique, du rendement de production d'acide lactique et du taux de croissance maximum sont respectivement, 13,44 g/l, 0,48 g/l.h, 3,21 g/g et 0,07 h⁻¹.

Par ailleurs, la concentration en acide lactique obtenue sur l'hydrolysate enzymatique supplémenté avec le sulfate d'ammonium est pratiquement proche de celle obtenue avec l'ajout de l'extrait de levure. Comme l'extrait de levure est une source d'azote qui n'est pas économiquement attractive en termes de coût, le sulfate d'ammonium a été utilisé comme une alternative intéressante pour la production d'acide lactique.

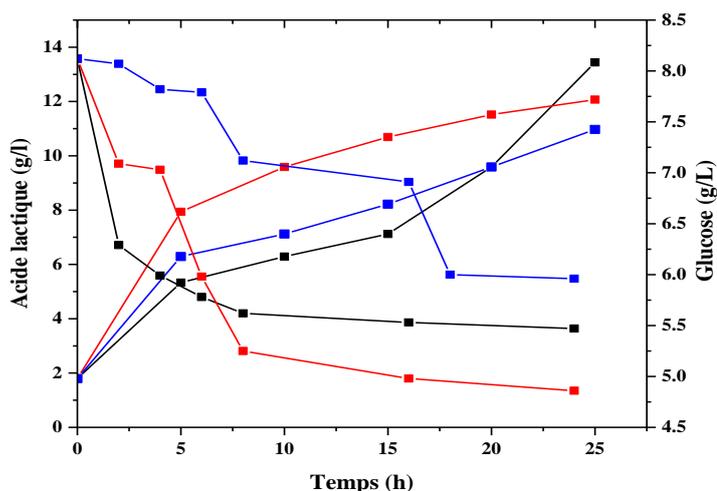


Figure 50. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation de sucres par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats enzymatiques supplémentés par différentes sources azotées

(■): Extrait de levure, (■): sulfate d'ammonium, (■): urée

2.2.2. Effet du carbonate de calcium sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysats enzymatiques par *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (Lc 20)

Plusieurs auteurs ont montré que l'acide lactique produit dans le milieu de culture peut exercer un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire des bactéries lactiques (Madzingaidzo et al., 2002; Milcent et Carrere, 2001).

Dans ce travail, les fermentations ont été réalisées en Erlenmeyers avec un pH non contrôlé. Durant les cultures de fermentation, le pH du milieu a tendance à s'acidifier suite à la production d'acide lactique. De ce fait, la diminution du pH entraîne une inhibition de la croissance de la souche. Afin d'éviter cette inhibition, il faut garder le pH dans une zone proche de la consigne en rajoutant un agent de neutralisation dans le milieu de culture. Dans notre cas, nous avons utilisé le carbonate de calcium (CaCO_3) à 2%.

Pour cela, plusieurs fermentations en cultures discontinues sur un milieu à base d'hydrolysats enzymatiques contenant 16 g/l de sucres réducteurs ont été réalisées:

- des fermentations sur hydrolysats enzymatiques seuls
- des fermentations sur hydrolysats enzymatiques + le carbonate de calcium

Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 51. Ces résultats ont montré que l'ajout du carbonate de calcium a un effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique. En effet, il a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 10,61% avec une concentration finale de 11,25 g/l par rapport à l'hydrolysate enzymatique seul, soit 10,17 g/l (Figure 51). La concentration du carbonate de calcium à 2% a été retenue pour la suite des essais.

Plusieurs travaux ont montré que le CaCO_3 est un agent tampon très efficace au niveau des fermentations (Huang et al., 2003; Naveena et al., 2004; Altaf et al., 2005; Qi et Yao, 2007; Markovic et al., 2011).

En effet, Djukic'-Vukovic' et al. (2012) ont montré que la meilleure concentration en acide lactique (18,58 g/l) ainsi que le meilleur rendement de bioconversion (73,4%) ont été obtenus dans un milieu de culture supplémenté par 1% de CaCO_3 .

Qi et Yao (2007), ont montré que le CaCO_3 a un effet significatif sur la production d'acide L(+) lactique par *Lactobacillus casei* sur les pailles de riz.

Altaf et al. (2006), ont également montré que la production d'acide lactique est significativement affectée par l'ajout de CaCO_3 dans un milieu de fermentation par *Lactobacillus amylophilus*.

Péjin et al. (2014), ont montré que l'ajout de CaCO_3 (2%) a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 13% par *Lactobacillus fermentum* et de 17% par *Lactobacillus rhamnosus* sur un milieu contenant l'hydrolysate de drêche de brasserie.

Cui et al. (2011), ont obtenu un rendement d'acide lactique de 59% par *Lactobacillus rhamnosus* sur un milieu à base de tiges de maïs supplémenté par le carbonate de calcium comme agent de neutralisation.

Marković et al. (2011), ont montré que l'ajout du CaCO_3 dans un milieu contenant les résidus de la distillation des moûts fermentés a un effet positif sur la croissance de *Lactobacillus*.

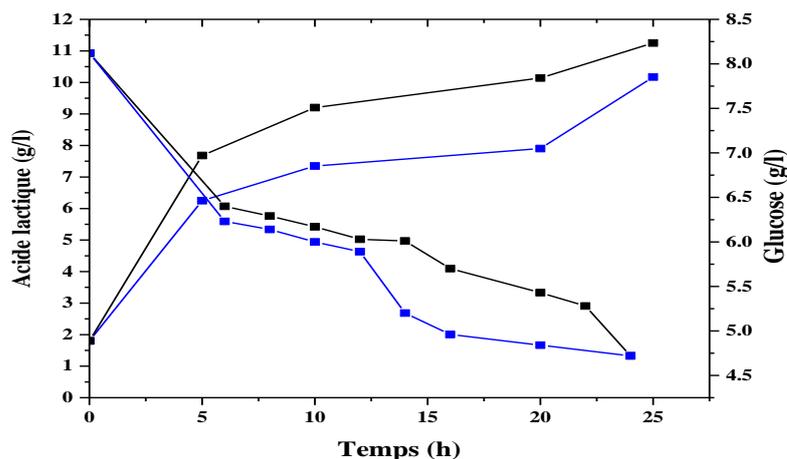


Figure 51. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysat enzymatique avec et sans ajout de CaCO₃

(■): Sans CaCO₃, (■): avec CaCO₃

2.2.3. Effet des sels minéraux et de la source azotée sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysat enzymatique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Les résultats obtenus dans les expériences précédentes ont montré que l'ajout des sels tels que MgSO₄, MnSO₄, CH₃COONa, K₂HPO₄, KH₂PO₄ ont un effet positif sur la croissance et la production d'acide lactique sur un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis*.

De plus, l'ajout de l'extrait de levure ou bien du sulfate d'ammonium (sélectionné comme alternative économique) ont également améliorés significativement la production d'acide lactique.

Par conséquent, il serait intéressant d'essayer d'enrichir le milieu de culture à base d'hydrolysat enzymatique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* par l'ajout de sels, de sources azotées et du CaCO₃. Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées :

- des fermentations sur hydrolysat enzymatique des cladodes contenant 16 g/l de sucres réducteurs supplémenté par le CaCO₃, les sels et l'extrait de levure.
- des fermentations sur hydrolysat enzymatique des cladodes contenant 16 g/l de sucres réducteurs supplémenté par le CaCO₃, les sels et le sulfate d'ammonium.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 52. Cette Figure montre que les meilleurs résultats sont obtenus sur le milieu contenant l'hydrolysate enzymatique supplémenté par le CaCO₃, les sels et l'extrait de levure. En effet, la concentration en acide lactique obtenue est de 16,19 g/l ce qui représente une amélioration de 9,24% par rapport à l'hydrolysate enzymatique supplémenté par le CaCO₃, les sels et le sulfate d'ammonium, soit 14,82 g/l.

On constate également une amélioration de la production d'acide lactique de 22,78% obtenue sur hydrolysate enzymatique supplémenté par le CaCO₃, les sels et le sulfate d'ammonium par rapport à l'hydrolysate enzymatique enrichi seulement par le sulfate d'ammonium. Ces résultats ont montré que le sulfate d'ammonium pourrait substituer l'extrait de levure et constituer ainsi une alternative économique intéressante pour la production d'acide lactique.

Sur la figure 52, on remarque aussi que la consommation des sucres sur hydrolysate enzymatique enrichi par l'extrait de levure est plus rapide que celle obtenue sur hydrolysate enzymatique enrichi par le sulfate d'ammonium.

Plusieurs études ont montré que l'extrait de levure est une source d'azote très efficace pour la production d'acide lactique. En effet, Péjin et al. (2015), ont montré que l'ajout de l'extrait de levure permet d'améliorer le rendement de production d'acide lactique de 4 à 26% par *Lactobacillus fermentum* et de 6 à 8 % par *Lactobacillus rhamnosus*. Cui et al. (2011), ont montré également que l'extrait de levure est un nutriment très efficace qui affecte la production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* à partir de permeat de lactosérum.

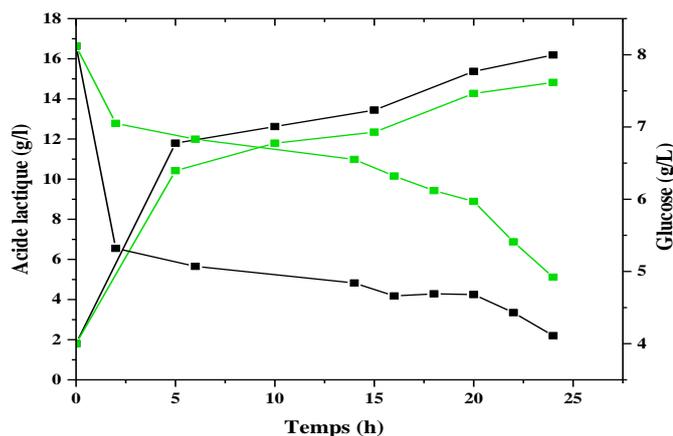


Figure 52. Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres sur hydrolysats enzymatiques supplémentés soit par l'extrait de levure soit par le sulfate d'ammonium

(■): extrait de levure + sels + CaCO₃, (■): sulfate d'ammonium+ sels + CaCO₃

2.3. Production d'acide lactique sur hydrolysats acides des cladodes d'*Opuntia ficus indica* par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

2.3.1. Effet de la détoxification de l'hydrolysats acides des cladodes sur la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Plusieurs études ont montré que l'hydrolyse acide de l'hémicellulose libère différents composés inhibiteurs présentant ainsi des effets négatifs sur le rendement et la productivité de la fermentation des levures. La composition de ces composés inhibiteurs varie considérablement en fonction de la méthode de prétraitement et de la matière première utilisée (Almeida et al., 2007; Chang et al., 2007).

Généralement, ces composés inhibiteurs sont divisés en trois groupes majeurs: les acides faibles (acide formique, acide levunique, acide acétique), les dérivés furane, et les composés phénoliques (Chandel et al., 2013; Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000). Parmi ces inhibiteurs, les composés phénoliques spécialement les phénols de faible poids moléculaire ont un effet inhibiteur sur les microorganismes plus important que celui des furfurals (Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000; Delgenes et al., 1996).

Cependant, à cause de la faible concentration des inhibiteurs et de leurs complexités, il reste encore difficile d'évaluer exactement la nature de la toxicité de l'hydrolysats (Jiang *et al.*, 2016).

La formation de ces composés inhibiteurs après une hydrolyse acide dépend de plusieurs facteurs tels que la nature de matière lignocellulosique, la composition de la paroi cellulaire, les conditions thermochimiques et le temps de la réaction d'hydrolyse (Palmqvist et Hahn-Hagerdal., 2000 a, b).

Parmi les techniques utilisées pour l'élimination de ces inhibiteurs, on retrouve la détoxification. Il s'agit d'un traitement de l'hydrolysats acide par le $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou le NaOH (Converti *et al.*, 2000). C'est une technique efficace qui permet de réduire la toxicité de divers hydrolysats (Palmqvist et Hahn-Hagerdal, 2000a). Cette technique consiste à augmenter le pH afin de précipiter les composés toxiques et améliorer ainsi les performances de la fermentation (Ronny *et al.*, 2004).

C'est dans cette optique que nous avons pensé qu'il serait intéressant de traiter l'hydrolysats acide des cladodes par une solution de NaOH pour essayer d'éliminer les composés toxiques. On commence par augmenter le pH jusqu'à 10 afin de précipiter les composés toxiques puis on diminue le pH jusqu'à 6 avec une solution d' H_2SO_4 et on rajoute à la fin 1g/l de sulfite (Converti *et al.*, 2000).

Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées sur deux types d'hydrolysats acides :

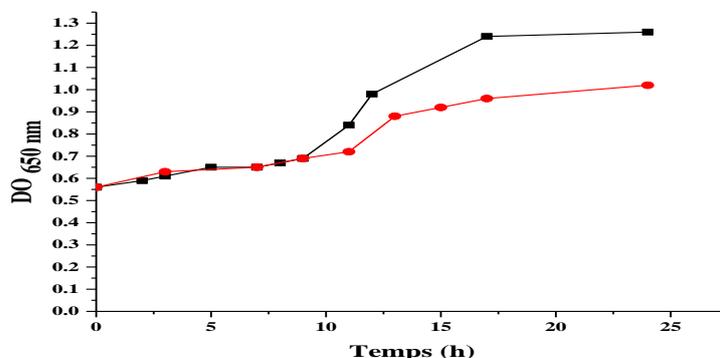
- un hydrolysats acide détoxifié
- un hydrolysats acide non détoxifié.

Pour toutes les fermentations la concentration initiale des sucres réducteurs d'hydrolysats acide de cladode est de 41 g/l.

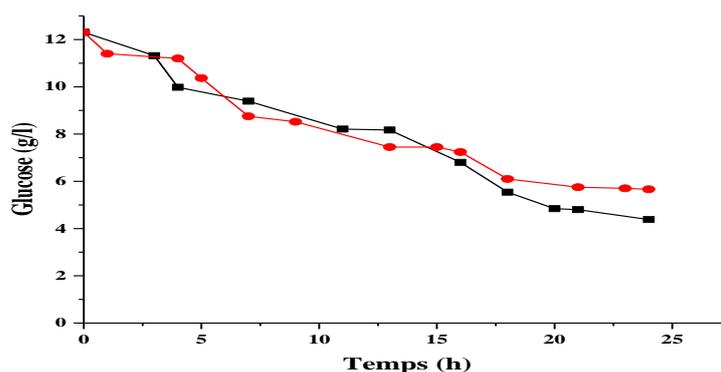
Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées sur la Figure 53 (A,B,C). Les paramètres cinétiques calculés sur les deux types d'hydrolysats sont regroupés dans le Tableau 43. Les résultats obtenus ont montré que la détoxification de l'hydrolysats acide des cladodes par une solution de NaOH a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 42,60% avec une concentration en acide lactique de 8,97 g/l par rapport à l'hydrolysats acide non détoxifié, soit 6,29 g/l..

Les meilleures performances de la fermentation en termes de production d'acide lactique (8,97 g/l), de rendement (1,87 g/g), de productivité volumique (0,33 g/l.h) et de taux de croissance maximum (0,028 h⁻¹) sont obtenues sur l'hydrolysats acide détoxifié (Tableau 43).

(A)



(B)



(C)

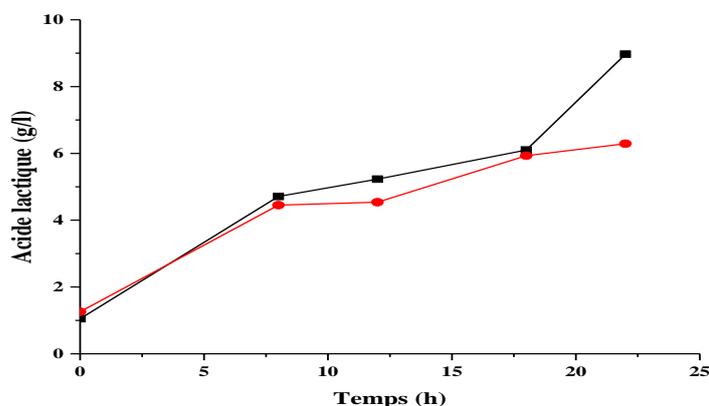


Figure 53 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats détoxifié et non détoxifié. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique. (■): hydrolysat détoxifié, (●): hydrolysat non détoxifié

Tableau 43. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (Lc 20) sur hydrolysat acide détoxifié ou non détoxifié.

Hydrolysat acide	Paramètres cinétiques			
	Lactate max (g/l)	Rendement $Y_{P/S}$	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance maximum μ_{max} (h^{-1})
Hydrolysat acide détoxifié	8,97	1,85	0,33	0,028
Hydrolysat acide non détoxifié	6,29	1,07	0,22	0,020

2.3.2. Effet de l'ajout des sels et des sources azotées sur la production d'acide lactique dans un milieu contenant l'hydrolysat acide détoxifié par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Les résultats obtenus dans les expériences précédentes ont montré que l'enrichissement de l'hydrolysat enzymatique des cladodes d'*Opuntia ficus indica* par les sels et l'extrait de levure a permis d'améliorer significativement la production d'acide lactique. C'est pourquoi, nous avons essayé dans cette partie d'étudier l'effet de la source azotée et les sels sur la production d'acide lactique sur un hydrolysat acide détoxifié.

2.3.2.1. Effet de l'ajout de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysat acide détoxifié

Afin de tester l'effet de l'extrait de levure sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysat acide détoxifié contenant 41 g/l de sucres réducteurs, plusieurs fermentations ont été réalisées à différentes concentrations initiales en extrait de levure (5, 10, 15 et 20 g/l). Ces fermentations ont été comparées avec celle contenant l'hydrolysat acide détoxifié sans ajout d'extrait de levure.

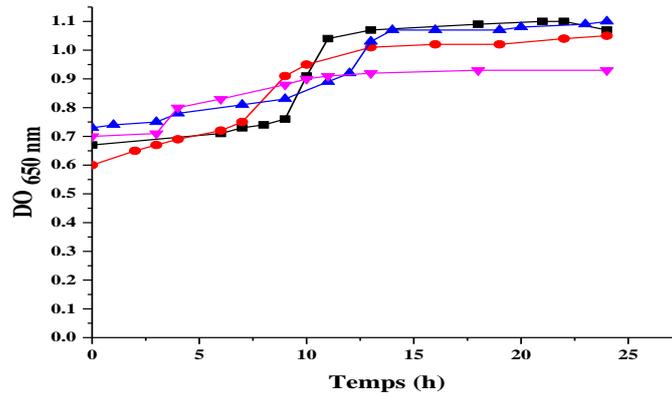
Les comportements cinétiques de la souche sont représentés sur la Figure 54 (A,B,C). Le Tableau 44 résume les principaux paramètres cinétiques.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de l'extrait de levure au milieu à base d'hydrolysate acide détoxifié a permis d'améliorer la production d'acide lactique par rapport à celui contenant seulement l'hydrolysate acide détoxifié. En effet, la concentration maximale en acide lactique obtenue (13,93 g/l) sur l'hydrolysate acide détoxifié est supérieure à celle obtenue (8,97 g/l) sur l'hydrolysate acide détoxifié seul (Tableau 44).

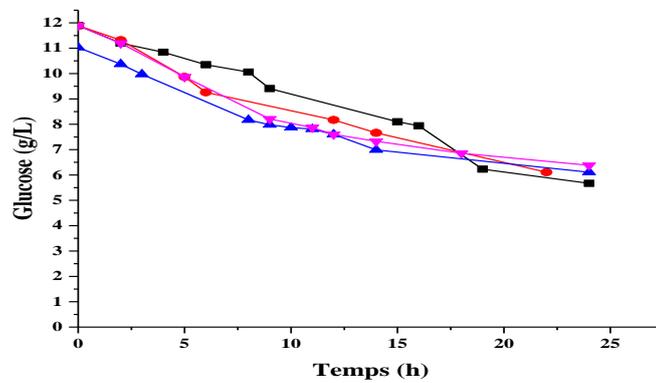
Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus sur un hydrolysate acide détoxifié avec une concentration optimale en extrait de levure de 5 g/l. Sous, ces conditions, les valeurs de la production d'acide lactique, de la productivité volumique et du taux de croissance maximum sont respectivement, 13,93 g/l, 0,50 g/l.h et 0,028 h⁻¹ (Tableau 44).

La concentration optimale d'extrait de levure à 5 g/l a été retenue pour la suite des essais.

(A)



(B)



(C)

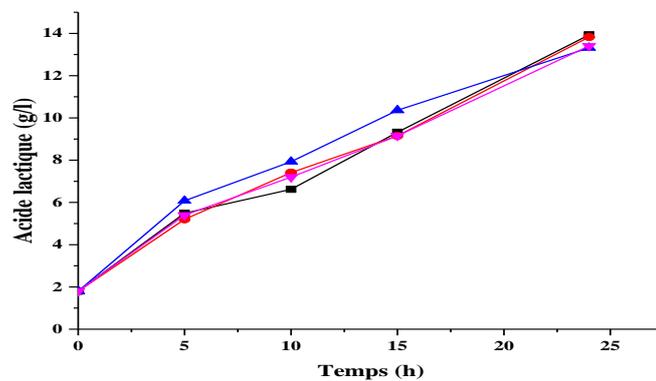


Figure 54 (A, B, C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats acide détoxifié à différentes concentrations initiales en extrait de levure. (■): 5 g/l, (●): 10 g/l, (▲): 15 g/l, (▼): 20 g/l. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique

Tableau 44. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LC 20) sur hydrolysat acide détoxifié à différentes concentrations initiales en extrait de levure.

Milieux	Paramètres cinétiques			
	Lactate (g/l)	Rendement $Y_{p/s}$ (g/g)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance μ_{max} (h ⁻¹)
Hydrolysat acide détoxifié (seul)	8,97	1,85	0,29	0,028
Hydrolysat acide détoxifié + Extrait de levure (5 g/l)	13,93	2,20	0,50	0,028
Hydrolysat acide détoxifié + Extrait de levure (10 g/l)	13,83	2,37	0,50	0,022
Hydrolysat acide détoxifié + Extrait de levure (15 g/l)	13,32	2,70	0,48	0,023
Hydrolysat acide détoxifié + Extrait de levure (20 g/l)	13,41	2,43	0,48	0,024

2.3.2.2. Effet de l'ajout des sels sur la production d'acide lactique sur l'hydrolysat acide détoxifié par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Afin d'améliorer davantage les performances de production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20), nous avons essayé de tester l'effet de l'ajout des sels sur la production d'acide lactique dans un milieu à base d'hydrolysat acide détoxifié contenant 41 g/l des sucres réducteurs enrichi avec 5g/l d'extrait de levure.

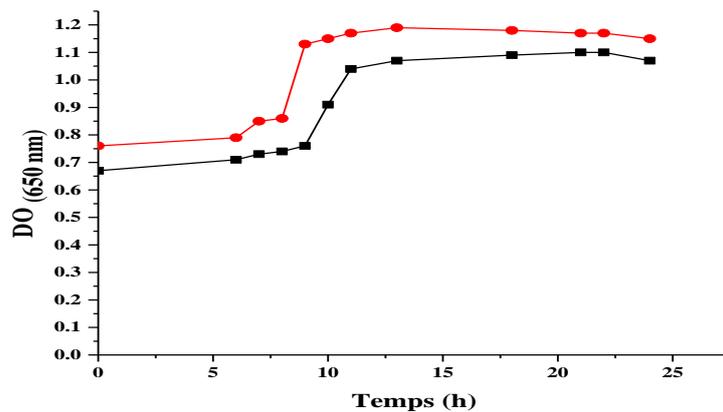
Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées puis comparées :

- des fermentations sur hydrolysats acides détoxifiés supplémentés par l'extrait de levure et les sels.
- des fermentations sur hydrolysats acides détoxifiés supplémentés seulement avec l'extrait de levure.

Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentées sur la Figure 55 (A,B). Les paramètres cinétiques sont résumés dans le Tableau 45.

Les résultats obtenus ont montré que l'ajout des sels au milieu contenant l'hydrolysats acides détoxifiés et l'extrait de levure a permis d'améliorer significativement la production d'acide lactique par rapport au milieu contenant seulement l'hydrolysats acides détoxifiés et l'extrait de levure. En effet, les meilleures performances des fermentations en termes de concentration maximale en acide lactique (16,85 g/l), de rendement (2,59 g/g), de productivité volumique (0,65 g/l.h) et de taux de croissance (0,029 h⁻¹) sont obtenues sur un milieu à base d'hydrolysats acides détoxifiés supplémentés avec l'extrait de levure et les sels.

(A)



(B)

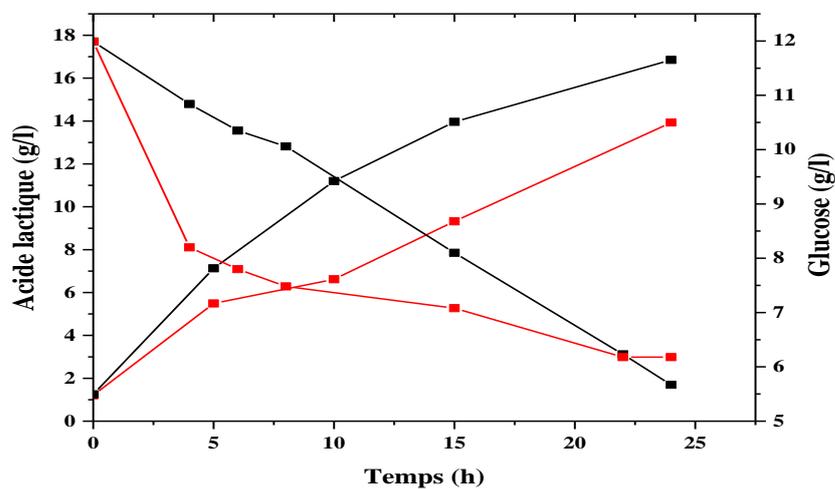


Figure 55 (A, B). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysat acide détoxifié supplémenté soit par les sels et l'extrait de levure soit par l'extrait de levure seulement.

(A): croissance, (B): consommation des sucres et production d'acide lactique.

(■): hydrolysat acide détoxifié + extrait de levure, (■): hydrolysat acide détoxifié + extrait de levure + sels

Tableau 45. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (Lc 20) sur hydrolysate acide détoxifié supplémenté soit par les sels et l'extrait de levure soit par l'extrait de levure seulement.

Milieux de culture	Paramètres cinétiques			
	Lactate max (g/l)	Rendement $Y_{p/s}$ (g/g)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)
Hydrolysate acide détoxifié + extrait de levure + sels	16,85	2,59	0,65	0,029
Hydrolysate acide détoxifié + extrait de levure	13,93	2,20	0,53	0,028

2.3.2.3. Substitution de l'azote totale d'extrait de levure par des sources azotées moins onéreuses et leur effet sur la production d'acide lactique sur hydrolysate acide détoxifié

Comme dans le cas des expériences précédentes, nous avons essayé dans cette partie de réduire le coût lié à l'extrait de levure en le substituant par d'autres sources azotées moins coûteuses. Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées avec différentes sources azotées sur un milieu contenant l'hydrolysate acide détoxifié des cladodes et les sels.

Pour toutes les fermentations la concentration initiale des sucres réducteurs d'hydrolysate acide des cladodes est de 41 g/l.

Les différentes sources azotées utilisées sont les suivantes : l'extrait de levure, la peptone, l'hydrolysate de caséine et la liqueur de "corn steep". La quantité de chaque source d'azote est calculée de façon à avoir une concentration d'azote totale équivalente à 5 g/l d'extrait de levure.

Les cinétiques des fermentations sont représentées sur la Figure 56 (A,B,C). Le Tableau 46 regroupe les paramètres cinétiques calculés sur les différentes fermentations.

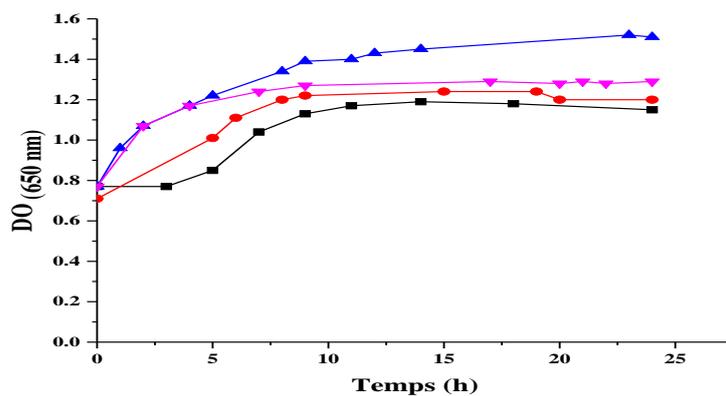
Il ressort de ce Tableau que les meilleurs résultats sont obtenus avec l'ajout de l'extrait de levure. En effet, l'ajout de l'extrait de levure dans le milieu culture à base d'hydrolysate acide détoxifié a permis d'améliorer les performances de la fermentation lactique, soit une concentration maximale d'acide lactique de 16,85 g/l, une productivité de 0,65 g/l.h et un taux de croissance maximum de 0,029 h⁻¹.

Nos résultats sont similaires à ceux de Yoo et *al.* (1997). Ils ont étudié l'effet de différentes sources azotées sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* et ils ont montré que les meilleurs résultats de production d'acide lactique ont été obtenus avec l'ajout de l'extrait de levure.

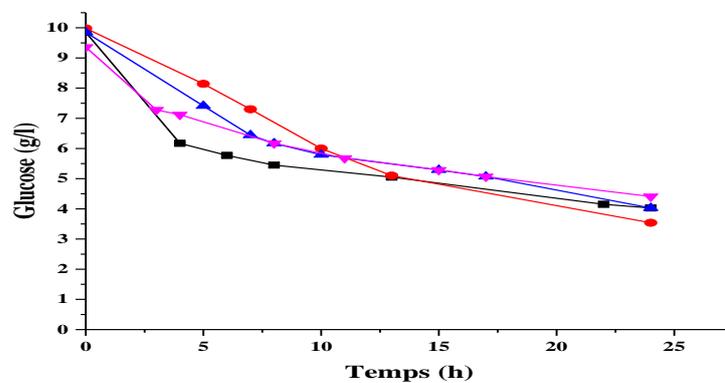
Cependant, l'ajout de la liqueur de "corn steep" dans le milieu de culture a permis d'obtenir une concentration maximale en acide lactique de 16,27 g/l qui est proche de celle obtenue avec l'ajout de l'extrait de levure, soit 16,85 g/l. Lei et *al.* (2008), ont observé le même effet et ont utilisé la liqueur de "corn steep" en tant que substituant de l'extrait de levure.

Par ailleurs, la peptone et l'hydrolysate de caséine semblent être intéressants de point de vue coût par rapport à l'extrait de levure mais avec une efficacité plus faible.

(A)



(B)



(C)

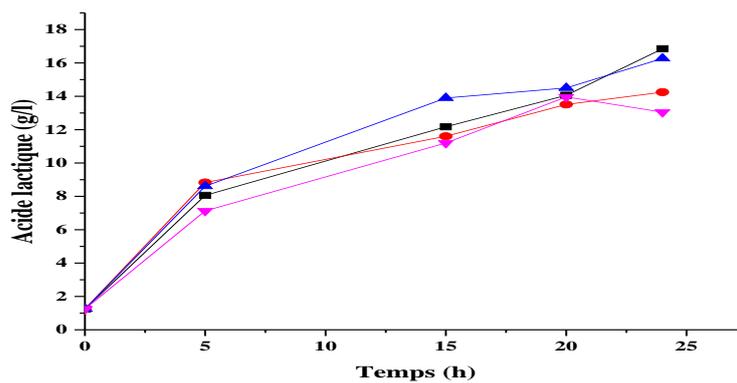


Figure 56 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* (Lc 20) sur hydrolysat acide détoxifié supplémenté par différentes sources azotées.

(A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique.

(■): Extrait de levure, (●): peptone, (▲): liqueur de "corn steep", (▼): hydrolysat de caséines.

Tableau 46. Paramètres cinétiques de production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) sur hydrolysats acides détoxifiés supplémentés par différentes sources azotées.

Milieux de culture	Paramètres cinétiques			
	Lactate (g/l)	Rendement $Y_{p/s}$ (g/g)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance max μ_{max} (h^{-1})
Hydrolysats acides détoxifiés + extrait de levure + sels	16,85	2,59	0,65	0,029
Hydrolysats acides détoxifiés + peptone + sels	14,25	2,03	0,54	0,012
Hydrolysats acides détoxifiés + hydrolysats de caséines + sels	13,05	2,62	0,49	0,116
Hydrolysats acides détoxifiés + corn steep + sels	16,27	2,50	0,62	0,018

3. Production d'acide lactique sur un milieu contenant un mélange de jus de fruit et d'hydrolysats acides détoxifiés par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)

Les expériences précédentes ont montré que la production d'acide lactique sur un milieu contenant le mélange du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysats acides détoxifiés de cladodes par *Lactococcus lactis* 19435 est meilleure que celle obtenue séparément sur ces deux milieux.

C'est pour cette raison que nous avons également étudié l'effet du mélange du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et de l'hydrolysats des cladodes sur la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (Lc 20).

Pour cela, plusieurs fermentations ont été réalisées sur un mélange de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysats acides détoxifiés des cladodes contenant 50 g/l de sucres réducteurs et ceci à différentes proportions:

- 25% de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et 75% d'hydrolysat acide des cladodes
- 75% de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et 25% d'hydrolysat acide des cladodes
- 50% de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et 50% d'hydrolysat acide des cladodes

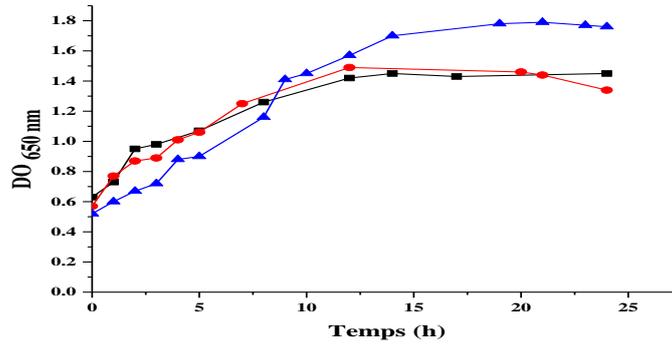
Les trois proportions ont été supplémentées par l'extrait de levure et les sels.

Les cinétiques de croissance, de production d'acide lactique et de consommation des sucres sur les trois milieux sont représentées sur la Figure 57 (A,B,C). Afin d'interpréter ces résultats, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés (Tableau 47).

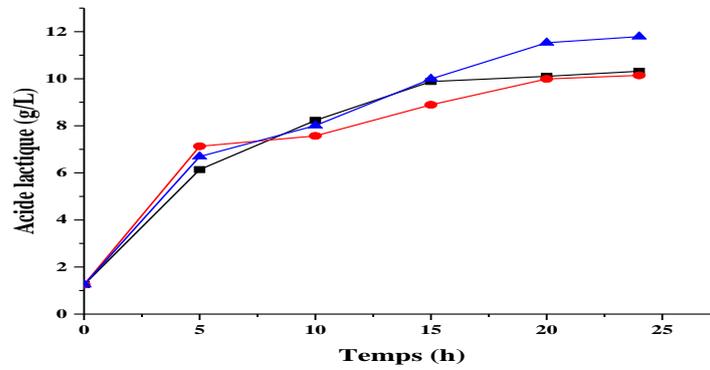
Les résultats obtenus montrent que la proportion du mélange contenant 75% de jus de fruit de d'*Opuntia ficus indica* et 25% d'hydrolysat acide des cladodes a permis d'améliorer les performances de la fermentation par rapport aux autres proportions. En effet, les valeurs de la production d'acide lactique, du rendement de production d'acide lactique, et de la productivité volumique sont 11,79 g/l, 55,43% et 0,43 g/l.h, respectivement.

D'après les résultats précédents, nous avons remarqué que les concentrations maximales de production d'acide lactique obtenues séparément sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* ou bien sur hydrolysat acide des cladodes sont respectivement 27,19 g/l et 16,85 g/l. Ces concentrations sont nettement supérieures à celle obtenue sur un mélange contenant du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysat acide des cladodes, soit 11,79 g/l.

(A)



(B)



(C)

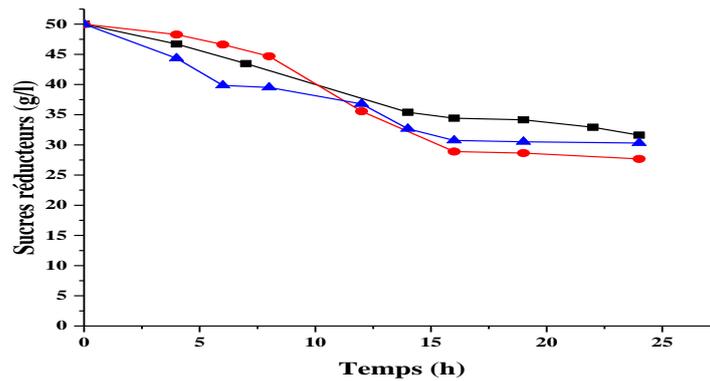


Figure 57 (A,B,C). Cinétiques de *Lactococcus lactis* (Lc 20) sur un mélange de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysat acide des cladodes.

(A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique.

(■): 25% de jus de fruit et 75% d'hydrolysat acide des cladodes, (▲): 75% de jus de fruit et 25% d'hydrolysat acide des cladodes, (●): 50% de jus de fruit et 50% d'hydrolysat acide des cladodes.

Tableau 47. Paramètres cinétiques de *Lactococcus lactis* (Lc 20) sur un mélange du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et d'hydrolysate acide des cladodes.

Paramètres	Milieux de culture		
	(25%) jus de fruit + (75%) hydrolysate acide des cladodes	(50%) jus de fruit + (50%) hydrolysate acide des cladodes	(75%) jus de fruit + (25%) hydrolysate acide des cladodes
Lactate max (g/l)	10,32	10,14	11,79
Rendement Y_{p/s} (%)	49,34	45,40	55,43
Productivité volumique (g/l.h)	0,37	0,37	0,43
Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	0,14	0,087	0,097
Taux de consommation des sucres (%)	36,76	44,66	39,4

VI. PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE EN CULTURE PURE ET MIXTE

1. Production d'acide lactique en culture pure

1.1. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysate acide des cladodes par *Lactobacillus casei* isolée à partir de leben

Lactobacillus casei est une bactérie couramment utilisée à l'échelle industrielle pour la production d'acide lactique (Zhao et al, 2013). Elle a l'avantage de tolérer des milieux acides et elle s'est prêle facilement aux modifications génétiques pour la production sélective des isomères d'acide lactique (Kyla-Nikkila et al, 2000). *Lactobacillus casei* est une bactérie lactique homofermentaire capable de produire le L(+) acide lactique.

C'est dans ce contexte, que nous avons essayé dans cette partie de tester les performances de *Lactobacillus casei* isolée de leben sur le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* d'une part, et sur l'hydrolysate acide des cladodes, d'autre part.

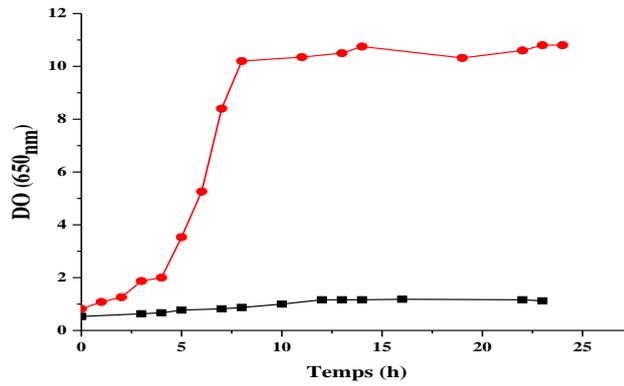
Pour cela, plusieurs fermentations en cultures discontinues ont été réalisées:

- des fermentations sur un milieu contenant 50 g/l de sucres de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* supplémenté par l'extrait de levure et les sels.
- des fermentations sur un milieu contenant 25 g/l de sucres d'hydrolysate acide des cladodes détoxifié supplémenté par l'extrait de levure et les sels.

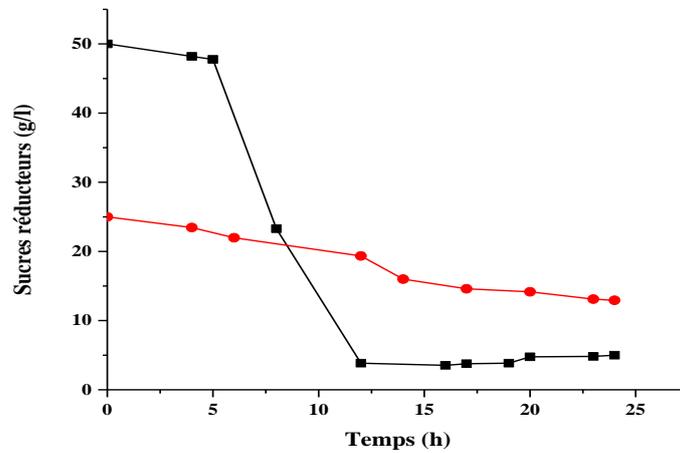
Les cinétiques de croissance, de consommation des sucres et de production d'acide lactique sont représentés sur la Figure 58 (A,B,C). Le Tableau 48 résume les principaux paramètres cinétiques calculés sur les deux milieux de fermentation.

Les résultats obtenus, ont montré que cette bactérie est capable d'utiliser aussi bien les sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* que ceux de l'hydrolysate acide des cladodes pour produire de l'acide lactique. Cependant, les meilleurs résultats sont obtenus sur un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*. En effet, sur un milieu de culture contenant le jus de fruit, les valeurs de la production d'acide lactique, de la productivité volumique, du taux de croissance maximum et du taux de consommation des sucres représentent 13,72 g/l, 0,48 g/l.h, 0,32 h⁻¹ et 90,02%, respectivement. Alors que sur un milieu contenant l'hydrolysate acide des cladodes, ces valeurs représentent 11,52 g/l, 0,38 g/l.h, 0,067 h⁻¹ et 48%, respectivement.

(A)



(B)



(C)

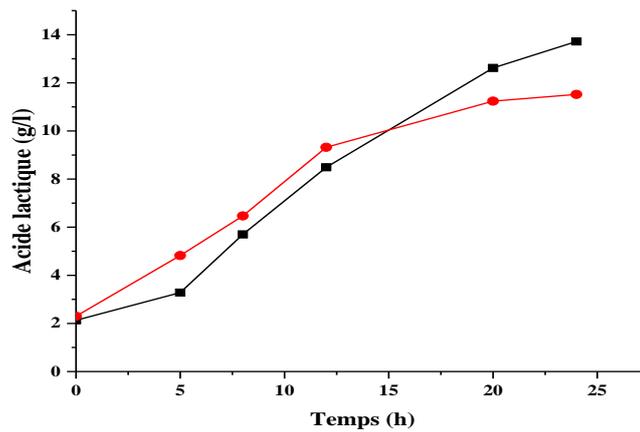


Figure 58 (A,B). Cinétique de *Lactobacillus casei* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysat acide des cladodes (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique.

(■): jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*, (●): hydrolysat acide des cladodes

Tableau 48. Paramètres cinétiques de *Lactobacillus casei* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysats acides des cladodes

Milieux de cultures	Paramètres cinétiques				
	Lactate max (g/l)	Rendement Yp/s (%)	Productivité (g/l.h)	Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	Taux de consommation des sucres (%)
Jus de fruit + extrait de levure + sels	13,72	25,74	0,48	0,32	90,02
Hydrolysats acides des cladodes + extrait de levure + sels	11,52	76,38	0,38	0,067	48,28

1.2. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysats acides des cladodes par *Corynebacterium glutamicum* 2262

Chez les Corynebactéries, il existe un grand nombre de souches et certaines présentent un intérêt industriel dont *Corynebacterium glutamicum* comme bactérie productrice de glutamate (Khuat et al., 2014).

Plusieurs études se sont intéressées à l'étude du mécanisme de production et de sécrétion de glutamate en jouant soit sur le procédé de culture soit en modifiant le métabolisme de *Corynebacterium glutamicum* (Kalinowski et al., 2003). Les souches de corynebactéries sont des souches aéro-anaérobies et leur métabolisme est respiratoire ou fermentatif. La limitation en oxygène pendant la croissance provoque l'accumulation de lactate, de succinate et d'acétate (Eggeling et bott, 2005 ; Chai et al., 2013). Chez *Corynebacterium glutamicum*, lorsque l'oxygène devient limitant, la cellule produit de l'acide lactique et de l'acide acétique.

C'est pour cette raison, nous avons essayé d'évaluer le potentiel d'une souche de *Corynebacterium glutamicum* 2262 thermoinductible sous les conditions de limitation d'oxygène pour la production d'acide lactique.

Pour cela, plusieurs fermentations en culture discontinues ont été réalisées:

- des fermentations sur un milieu contenant 50 g/l de sucres réducteurs de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*
- des fermentations sur un milieu contenant 25 g/l de sucres réducteurs d'hydrolysate acide des cladodes ditiopifié

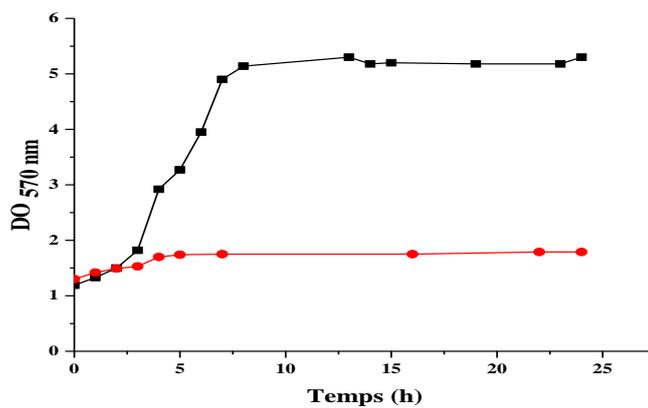
Les deux milieux ont été supplémentés par les sources azotées, les sels et les vitamines nécessaires à la croissance de la souche. Ces derniers ont été déjà optimisés par des travaux antérieurs.

Les comportements cinétiques de la souche sont représentés sur la Figure 59 (A,B,C). Les paramètres cinétiques sont regroupés dans le Tableau 49.

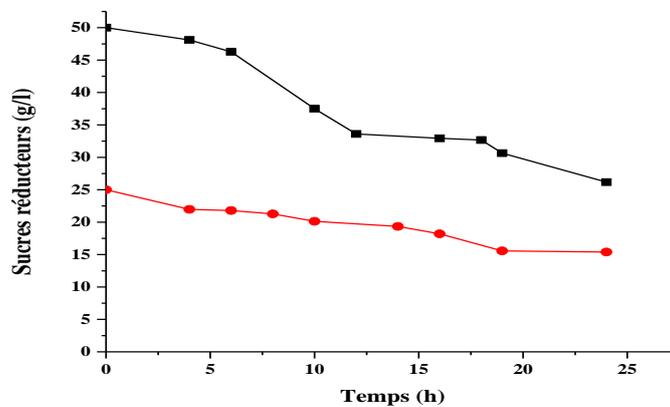
D'après les résultats obtenus dans le Tableau 49, *Corynebacterium glutamicum* 2262 est capable de croître et de produire l'acide lactique sur les deux milieux utilisés. Cependant, les résultats obtenus sur le milieu contenant le jus de fruit sont nettement supérieurs que ceux obtenus sur le milieu contenant l'hydrolysate acide des cladodes. En effet, les valeurs de la production d'acide lactique, de la productivité volumique, du taux de croissance maximum et du taux de consommation des sucres représentent respectivement 9,99 g/l, 0,37 g/l.h, 0,21 h⁻¹ et 47,67%. Alors que, dans le cas du milieu contenant l'hydrolysate acide, ces valeurs représentent, 7,90, 0,30 g/l.h, 0,067 h⁻¹ et 31,6%, respectivement.

Donc, en termes de performances, *Corynebacterium glutamicum* 2262 est plus efficace sur jus de fruit que sur hydrolysate acide des cladodes. Cependant, elle est moins performante dans la production d'acide lactique par rapport aux autres souches utilisées.

(A)



(B)



(C)

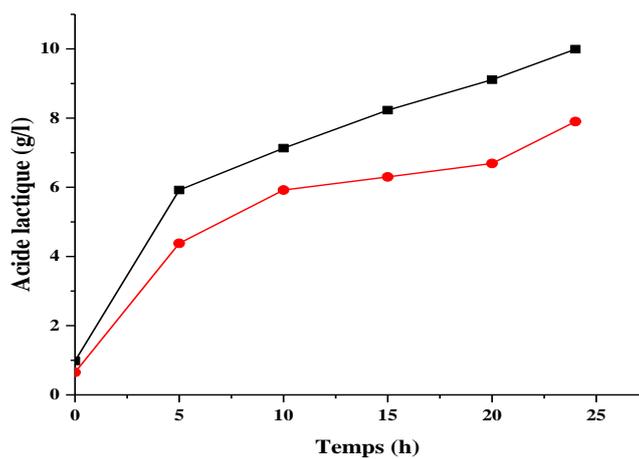


Figure 59 (A,B,C). Cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysat acide des cladodes. (A): croissance, (B): consommation des sucres, (C): production d'acide lactique

(■): jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*, (●): hydrolysat acide des cladodes

Tableau 49. Paramètres cinétiques de *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* et sur hydrolysate acide des cladodes.

Milieux de culture	Paramètres cinétiques				
	Lactate max (g/l)	Rendement Yp/s (%)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de croissance max μ_{max} (h ⁻¹)	Taux de consommation des sucres (%)
Jus de fruit d' <i>Opuntia ficus indica</i>	9,99	37,82	0,37	0,21	47,64
Hydrolysate acide des cladodes	7,90	75,44	0,30	0,067	31,6

2. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte

2.1. Production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte par *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei*

Après avoir étudié la production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* à partir de cultures de souches pures, nous avons essayé d'étudier les performances de production d'acide lactique sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en cultures de souches mixtes. Les souches utilisées dans ce type de culture sont *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*.

Plusieurs fermentations en cultures discontinues ont été réalisées en culture mixte de *Lactobacillus casei* et de *Lactococcus lactis* (Lc 20) à des proportions différentes sur un milieu contenant le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*. Les proportions des deux souches utilisées en culture mixte sont les suivantes:

- (25%) *Lactococcus lactis* et (75%) *Lactobacillus casei*
- (75%) *Lactococcus lactis* et (25%) *Lactobacillus casei*
- (50%) *Lactococcus lactis* et (50%) *Lactobacillus casei*

Le milieu utilisé est composé de 50 g/l de sucres de jus de fruit, les sels minéraux et 10 g/l d'extrait de levure. Les fermentations sont réalisées dans les conditions suivantes : une température de 33,5°C, un pH de 6 et une vitesse d'agitation de 200 rpm. L'âge d'inoculum est de 6h pour *Lactococcus lactis* et 4h pour *Lactobacillus casei*.

Les cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei* sont représentées sur la Figure 60 (A,B). Afin d'interpréter les résultats obtenus, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés (Tableau 50).

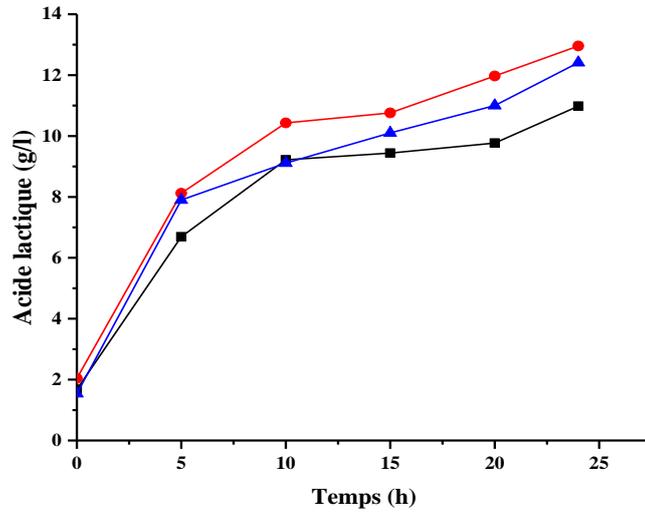
Après 24 h de fermentation les concentrations cellulaires obtenues sur les cultures mixtes de 75% de *L. lactis* et 25% de *L. casei*, de 50% de *L. lactis* et 50% de *L. casei* et de 25% de *L. lactis* et 75% de *L. casei* sont respectivement 76.10^7 UFC/ml, 23.10^7 UFC/ml, 35.10^7 UFC/ml pour *L. lactis* et $88,7.10^8$ UFC/ml, $7,16.10^8$ UFC/ml $105,62.10^8$ UFC/ml pour *L. casei*. A partir de ces résultats on remarque que plus le nombre des colonies est important, plus la production d'acide lactique est faible. Ceci signifie probablement que la croissance est favorisée par rapport à la production d'acide lactique.

D'après le Tableau 50, les meilleurs résultats sont obtenus en culture mixte avec une proportion de (75%) de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et (25%) de *Lactobacillus casei*. En effet, les valeurs de la production d'acide lactique, de la productivité et du taux de consommation des sucres sont supérieures à celles obtenues dans les autres proportions de culture mixte.

Cependant, les expériences précédentes ont montré que les performances de production d'acide lactique en culture pure de *Lactococcus lactis* (Lc 20) ou bien *Lactobacillus casei* sont meilleures que celles obtenues en culture mixte de ces deux souches. En effet, les concentrations maximales en acide lactique produites en culture pure par *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei* sont respectivement, 27,19 g/l et 13,72 g/l. Alors que, la concentration maximale en acide lactique obtenue en culture mixte est de 12,96 g/l.

Ces résultats montrent clairement que les cultures pures de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei* sont plus performantes dans la production d'acide lactique que les cultures mixtes.

(A)



(B)

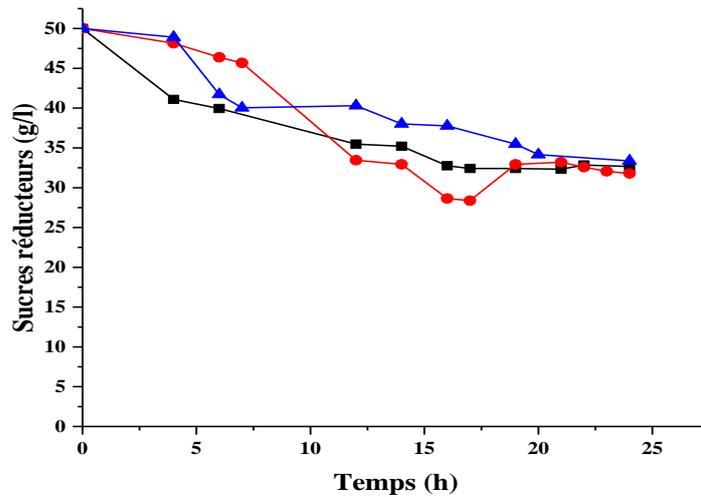


Figure 60 (A,B). Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei*.

(A): production d'acide lactique, (B): consommation des sucres

(●): (25%) *Lactococcus lactis* et (75%) *Lactobacillus casei*, (▲): (75%) *Lactococcus lactis* et (25%) *Lactobacillus casei*, (■): (50%) *Lactococcus lactis* et (50%) *Lactobacillus casei*

Tableau 50. Paramètres cinétiques de la culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei* sur le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

Cultures mixtes	Lactate max (g/l)	Rendement Yp/s (%)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de consommation des sucres (%)
(25%) <i>LC</i> (75%) <i>LB</i>	10,98	56,14	0,38	34,66
(75%) <i>LC</i> (25%) <i>LB</i>	12,96	64,3	0,45	36,42
(50%) <i>LC</i> (50%) <i>LB</i>	12,41	67,10	0,45	33,26

LC: *Lactococcus lactis*, *LB*: *Lactobacillus casei*

2.2. Production d'acide lactique sur le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum* 2262

Suite à la dernière expérience réalisée en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Lactobacillus casei*, nous avons essayé cette fois de tester une autre culture mixte avec *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum* 2262 sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* pour la production d'acide lactique.

Plusieurs fermentations en cultures mixtes ont été réalisées à des proportions différentes sur un milieu contenant le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*. Les proportions des deux souches utilisées en culture mixte sont les suivantes:

- (25%) *Lactococcus lactis* et (75%) *Corynebacterium glutamicum*
- (75%) *Lactococcus lactis* et (25%) *Corynebacterium glutamicum*
- (50%) *Lactococcus lactis* et (50%) *Corynebacterium glutamicum*

Le milieu utilisé est composé de 50 g/l de sucres de jus de fruit, les sels minéraux et 10 g/l d'extrait de levure. Les fermentations sont réalisées dans les conditions suivantes : une température de 33,5°C, un pH de 6 et une vitesse d'agitation de 200 rpm. L'âge d'inoculum est de 6h pour *Lactococcus lactis* et 8h pour *Corynebacterium glutamicum*.

Les cinétiques de production d'acide lactique et le taux de consommation des sucres sont représentés sur la Figure 61 (A,B). Les principaux paramètres cinétiques sont résumés dans le Tableau 51.

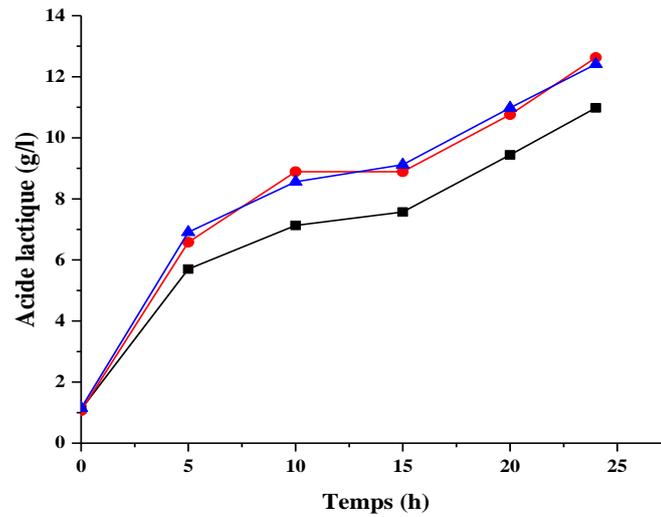
Après 24 h de fermentation les concentrations cellulaires obtenues sur les cultures mixtes de 75% de *L. lactis* et 25% de *C. glutamicum*, de 50% de *L. lactis* et 50% de *C. glutamicum* et de 25% de *L. lactis* et 75% de *C. glutamicum* sont respectivement 165.10^6 UFC/ml, 136.10^6 UFC/ml, 153.10^6 UFC/ml pour *L. lactis* et $21,3.10^7$ UFC/ml, $24,6.10^7$ UFC/ml, 34.10^7 UFC/ml pour *C. glutamicum*. Comme dans le cas de la culture mixte de *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*, on remarque la même évolution du nombre de colonies à différents proportions. Cela veut dire que l'augmentation du nombre de colonies entraîne une diminution de la production d'acide lactique. Ceci peut être expliqué probablement par un flux carboné important vers la croissance.

Les résultats obtenus ont montré que la meilleure production en acide lactique maximale (12,63 g/l) est obtenue en culture mixte avec une proportion de (75%) *Lactococcus lactis* et (25%) *Corynebacterium glutamicum*.

Les performances de production d'acide lactique en culture mixte ont été comparées avec celle de la culture pure de *Lactococcus lactis* (Lc 20). Il ressort que la concentration en acide lactique obtenue en cultures pure de *Lactococcus lactis* (Lc 20) est de 27,19 g/l. Elle est nettement supérieure à celle obtenue en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum*, soit une concentration en acide lactique de 12,63 g/l.

En conclusion, on peut dire que les cultures pures et en particulier avec *Lactococcus lactis* (Lc 20), sont plus efficaces en matière de production d'acide lactique par rapport aux cultures mixtes.

(A)



(B)

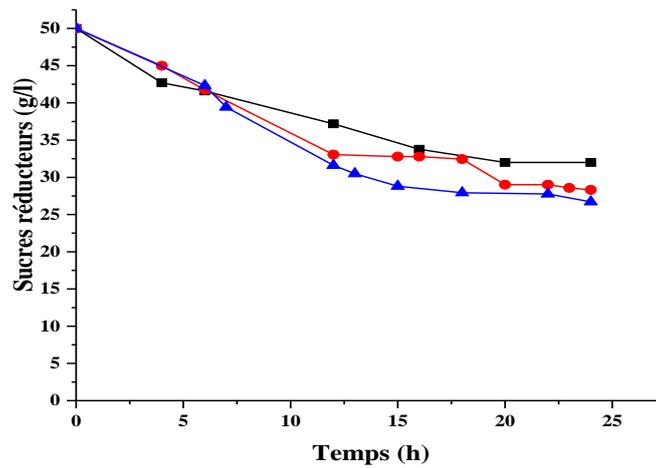


Figure 61 (A,B). Cinétiques de production d'acide lactique et de consommation des sucres du jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum*.

(A): production d'acide lactique, (B): consommation des sucres

(■): (25%) *Lactococcus lactis* et (75%) *Corynebacterium glutamicum*, (●): (75%) *Lactococcus lactis* et (25%) *Corynebacterium glutamicum*, (▲): (50%) *Lactococcus lactis* et (50%) *Corynebacterium glutamicum*

Tableau 51. Paramètres cinétiques de la culture mixte de *Lactococcus lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum* sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

Cultures mixtes	Lactate max (g/l)	Rendement Yp/s (%)	Productivité volumique (g/l.h)	Taux de consommation des sucres (%)
(25%) LC (75%) C	10,98	61,08	0,41	32,48
(75%) LC (25%) C	12,63	52,49	0,48	43,36
(50%) LC (50%) C	12,41	47,91	0,46	46,58

LC: *Lactococcus lactis* , C: *Corynebacterium glutamicum*

CONCLUSION
GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce travail était la mise au point et l'optimisation des milieux de cultures à base de jus de fruit et d'hydrolysats de cladodes d'*Opuntia ficus indica* pour la production d'acide lactique à partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en utilisant l'approche statistique.

Les principaux résultats obtenus au cours de notre travail sont indiqués ci-dessous :

La première partie a été consacrée à la production d'acide lactique en utilisant le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en tant que source de carbone à partir de deux souches de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20)).

Les résultats obtenus avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 ont montré que le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique. La concentration optimale des sucres totaux du jus de fruit est de 80 g/l avec une production maximale d'acide lactique de 12,87 g/l. L'enrichissement du milieu à base de jus de fruit en sels minéraux et en extrait de levure a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 53,8%, soit une concentration maximale de 19,8 g/l.

Dans le cas de la souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) isolée à partir de lait de chamelle sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*, la concentration maximale en acide lactique produite est de 10,10 g/l. L'ajout des sels minéraux au milieu de culture a permis une amélioration de la production d'acide lactique de 17,42%, soit une concentration de 11,86 g/l.

L'optimisation de ce milieu a été réalisée en appliquant le modèle composite centré. Trois facteurs particulièrement influents sur la production d'acide lactique ont été étudiés : la concentration des sucres du jus de fruit, la concentration d'extrait de levure et l'âge d'inoculum. Les résultats de l'optimisation estimés par le modèle composite centré sont les suivants : une concentration en sucres réducteurs de 60 g/l, une concentration d'extrait de levure de 11 g/l et un âge d'inoculum de 10 h. Une concentration d'acide lactique de 32,5 g/l est obtenue avec les conditions optimales simulées par le modèle composite centré. Cette concentration est très proche de celle estimée par le modèle, soit 33 g/l. Ceci montre une bonne corrélation entre la concentration mesurée et celle estimée par le modèle. Ces résultats confirment la validité du modèle composite centré.

Afin de minimiser le coût lié à l'extrait de levure, nous avons tenté de trouver une source d'azote efficace et de faible coût. Différentes sources azotées ont été testées et comparées: le sulfate d'ammonium, l'urée, la peptone, l'hydrolysate de caséines, la liqueur de « corn steep » et l'extrait de levure. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace. Le sulfate d'ammonium semble être une bonne alternative pour réduire le coût de l'ajout de l'extrait de levure, suivi par l'hydrolysate de caséine, la peptone et l'urée. Les autres sources azotées sont des substituants possibles de l'extrait de levure particulièrement le sulfate d'ammonium mais moins efficace que l'extrait de levure. Le sulfate d'ammonium a été retenu pour la suite des essais.

Une substitution partielle de l'extrait de levure par plusieurs combinaisons de deux sources azotées de faible coût avec des proportions différentes a été également testée. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement du milieu avec une proportion de 75% d'extrait de levure et 25% d'urée a permis d'obtenir une production d'acide lactique de 25,13 g/l. Une valeur presque similaire (24,44 g/l) est obtenue avec 75% de sulfate d'ammonium et 25% d'extrait de levure. Le sulfate d'ammonium peut donc réduire le coût de l'ajout de l'extrait de levure.

Il ressort de ces résultats que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace pour la production d'acide lactique. Ceci est dû probablement à la présence des vitamines du groupe B dans l'extrait de levure. Afin de confirmer cette hypothèse, une substitution partielle ou totale de l'extrait de levure par une source azotée de faible coût (l'urée) et par des vitamines du groupe B a été réalisée. Les résultats obtenus ont montré que l'ajout des vitamines du groupe B au milieu de culture a permis d'améliorer la production d'acide lactique. La substitution partielle par une autre source azotée (75% d'extrait de levure, 25% d'urée et des vitamines du groupe B) semble la voie la plus réaliste pour réduire l'ajout de l'extrait de levure.

La deuxième partie a été basée sur l'optimisation des paramètres de l'hydrolyse des cladodes d'*Opuntia ficus indica* en utilisant un plan composite centré qui fait appel à la méthodologie de la surface de réponses. Ce modèle a permis de calculer les corrélations de deux facteurs ayant effet significatif et la détermination de leurs optima. Les conditions optimales d'hydrolyse des cladodes estimées par le modèle composite centré sont les suivantes : une concentration en acide sulfurique de 6,8%, et un temps de prétraitement de 92,4 mn. Sous ces conditions, la concentration maximale des sucres réducteurs est de 40,95

g/l. Cette concentration est proche de celle estimée par le modèle statistique qui évalue la concentration des sucres réducteurs à 42 g/l. Ceci confirme la fiabilité du modèle utilisé.

La troisième partie consiste à l'étude de la production d'acide lactique sur hydrolysats de cladodes par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20).

Les résultats obtenus avec *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 ont montré que la production d'acide lactique sur hydrolysats acides seuls est de 8,91 g/l. L'ajout des sels au milieu a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 22,2% soit une concentration de 10,89 g/l. Les meilleures performances de production d'acide lactique sont obtenues sur un mélange de jus de fruit (95%) et d'hydrolysats acides (5%), soit une concentration de 13,86 g/l.

Les performances de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) ont été testées sur différents types d'hydrolysats : hydrolysats acides, hydrolysats enzymatiques, hydrolysats acides suivis par une hydrolyse enzymatique et hydrolysats enzymatiques suivis par une hydrolyse acide. Les meilleurs résultats sont obtenus sur un milieu à base d'hydrolysats enzymatiques. L'hydrolyse mixte reste moins efficace que l'hydrolyse acide. Pour cette raison, l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse acide ont été retenues pour la suite des fermentations.

Afin d'améliorer les performances de production d'acide lactique sur milieu à base d'hydrolysats enzymatiques par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20), plusieurs sources azotées ont été testées : extrait de levure, sulfate d'ammonium, et urée. Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'extrait de levure, la concentration maximale en acide lactique obtenue est de 13,44 g/l. La concentration en acide lactique obtenue sur hydrolysats enzymatiques supplémentés avec du sulfate d'ammonium est de 12,17 g/l. Cette dernière est proche de celle obtenue avec l'extrait de levure. Le sulfate d'ammonium pourrait être utilisé comme alternative de l'extrait de levure.

L'ajout du carbonate de calcium (CaCO_3) à 2% en tant qu'agent de neutralisation dans le milieu de culture à base d'hydrolysats enzymatiques a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 10,61% avec une concentration maximale de 11,25 g/l.

L'enrichissement du milieu de culture à base d'hydrolysats enzymatiques de cladodes par l'ajout d'extrait de levure, de sels minéraux et de CaCO_3 a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 20,46% avec une production d'acide lactique de 16,19 g/l.

L'hydrolyse acide de la matière lignocellulosique génère différents composés inhibiteurs présentant ainsi des effets néfastes sur les performances de la fermentation. Afin d'éliminer ces composés toxiques, l'hydrolysats acide des cladodes a été traité par une solution de NaOH. Les résultats obtenus ont montré que l'hydrolysats acide détoxifié a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 25%.

L'ajout de l'extrait de levure à une concentration de 5 g/l au milieu à base d'hydrolysats acide détoxifié a permis d'améliorer la production d'acide lactique. La concentration maximale obtenue est de 13,93 g/l. Elle est nettement supérieure à celle obtenue sur hydrolysats acide détoxifié sans extrait de levure, soit une concentration de 6,29 g/l.

L'ajout des sels et de l'extrait de levure au milieu contenant l'hydrolysats acide détoxifié a permis d'améliorer davantage la production d'acide lactique. Une concentration maximale en acide lactique de 16,85 g/l est obtenue.

Afin de réduire le coût lié à l'extrait de levure, différentes sources azotées ont été testées sur le milieu à base d'hydrolysats acide détoxifié : la peptone, l'hydrolysats de caséine, la liqueur de « corn steep » et l'extrait de levure. Les meilleurs résultats sont obtenus avec l'extrait de levure, soit une production d'acide lactique de 16,85 g/l. L'ajout de la liqueur de « corn steep » a permis d'obtenir une concentration en acide lactique de 16,27 g/l proche de celle obtenue avec l'extrait de levure. L'ajout de la liqueur de « corn steep » semble aussi être une alternative intéressante avec une production d'acide lactique de 16,27 g/l proche de celle obtenue avec l'extrait de levure.

La production d'acide lactique sur milieu contenant un mélange de jus de fruit et d'hydrolysats acide par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) a été évaluée. Les résultats obtenus ont montré que les concentrations maximales de production d'acide lactique obtenues séparément sur jus de fruit ou bien sur hydrolysats acide des cladodes sont supérieures à celle obtenue sur le mélange.

La dernière partie est consacrée à la production d'acide lactique en culture pure et mixte sur un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica*.

Les résultats obtenus ont montré que les concentrations en acide lactique obtenues en culture pure de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) (27,19 g/l) et *Lactobacillus casei* (18,72 g/l) sont meilleures que celle obtenue en culture mixte (12,96 g/l).

Les résultats obtenus ont montré également que les performances de production d'acide lactique de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Lc 20) et *Corynebacterium glutamicum* 2262 en culture pure sont meilleures que celles obtenues en culture mixte.

Ceci est du probablement aux difficultés rencontrés au cours de l'optimisation des conditions de culture pour chaque souche, tels que le pH, la température, la demande en oxygène et la composition du milieu de culture.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail permet d'envisager plusieurs perspectives d'investigations. Les principales sont les suivantes :

- Il serait intéressant de valoriser les graines d'*Opuntia ficus indica* qui sont riches en acide aminées en les utilisant en tant que source azotée pour la production d'acide lactique.
- Il serait important d'effectuer une saccharification et fermentation simultanée pour la production d'acide lactique à partir de la biomasse lignocellulosique de cladodes d'*Opuntia ficus indica*.
- Il serait intéressant de tester les performances de la production d'acide lactique en fermenteur en mode de culture discontinue.
- Il serait souhaitable de compléter l'étude par des fermentations en culture semi-continue et continue sur le jus de fruit et sur l'hydrolysate de cladodes d'*Opuntia ficus indica*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aarnikunnas J. (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially important compounds. Thesis. University of Helsinki. Helsinki. pp. 10-20.

Abid A., Zouhri A., Ider A., Kholtei S. (2009). Valorisation d'un nouveau bio flocculant (extrait de cactus) dans le traitement physico-chimique des rejets liquides chargés en cuivre, en zinc et en matière en suspension. *Rev Energ Renouv.*, 12: 321-330.

Abidi S., Ben Salem H., Vasta V., Priolo A. (2009). Supplementation with barley or spineless cactus (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*) cladodes on digestion, growth and intramuscular fatty acid composition in sheep and goats receiving oaten hay. *Small Rumin Res.*, 87:9-16.

Adamberg K., Kask S., Laht T., Paalme T. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol.*, 85:171-183.

Ahmad A., Davies J., Randall S., Skinner GRB. (1996). Antiviral properties of extract of *Opuntia streptacantha*. *Antiviral Res.*, 30:75-85.

Alimi H., Hfaeidha N., Bouonia Z., Saklyb M., Ben Rhoumab K. (2013). Ameliorative effect of *Opuntia ficus indica* juice on ethanol-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Exp Tox Pathol.*, 65:391-396.

Almeida JR., Modig T., Petersson A., Hähn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund MF. (2007). Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J chem technol biotechnol.*, 82:340-349.

Altaf M., Naveena BJ., Venkateshwar M., Kumar EV., Reddy G. (2006). "Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract - Optimisation by RSM". *Process Biochem.*, 41: 465-472.

Alvarez M., Aguirre-Ezkauriatza EJ., Ramirez-Medrano A., Rodriguez-Sanchez A. (2010). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. J Dairy Sci., 93:5552-5560.

Arba M. (2009). Le cactus *Opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. Symposium international agriculture durable en région méditerranéenne (AGDUMED). Rabat, Maroc. pp. 215-223.

Axelsson L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: S. Salminen, A. von Wright and A. C. Ouwehand, Eds., Lactic Acid Bacteria: Microbiol Functional Aspects, Marcel Dekker, New York. pp. 1-66.

B

Bai D., Wei Q., Yan Z., Zhao X., Li X., Xu S. (2003). Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. Biotechnol Lett., 25:1833-1835.

Bayitse R. (2015). Lactic Acid Production from Biomass: Prospect for Bioresidue Utilization in Ghana: Technological Review. Int J Appl Sci Technol., 5:164-174.

Bianchi MM., Brambilla L., Protani F., Liu C., Lievense J., Porro D. (2001). Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with heterologous *LDH* gene. Appl Environ Microbiol., 67:5621-5625.

Black CC., Osmond CB. (2003). Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift' Photosynthesis Research. Kluwer Acad Publish., 76:329-341.

Boontawan P., Kanchanathawe S., Boontawan A. (2011). Extractive fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique. Biochem Eng J., 54: 192-199.

Borgardt P., Krischke W., Trosch W., Brunner H. (1998). Integrated bioprocess for the simultaneous production of lactic acid and dairy sewage treatment. Bioprocess Eng., 19:321-329.

Burgos-Rubio CN., Okos MR., Wankat PC. (2000). Kinetic study of the conversion of different substrates to lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol Progr.*, 16:305-314.

Butera D., Tesoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi AM., Kohen R., Livrea MA. (2002). Antioxidant activities of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem.*, 50:6895-6901.

Buyukkileci A O., Harsa S. (2004). Batch production of (L) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Chem Technol.*, 79:1036-1040.

C

Chagnon P. (2005). Les plans d'expériences (parties 2) les modèles de régression Contrôles-essais-mesures. Commission de Normalisation AFNOR X06E "Méthodes statistiques". pp. 97-100.

Chai X., Shang X., Zhang Y., Liu S., Liang Y., Zhang Y., Wen T. (2016). A novel pyruvate kinase and its application in lactic acid production under oxygen deprivation in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Biotechnol.*, 16:79.

Chandel AK., Da Silva SS., Singh OV. (2013). Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *Bioenergy Res.*, 6:388-401.

Chang Q., Griest TA., Harter TM., Petrash JM. (2007). Functional studies of aldo-keto reductases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res.*, 1773:321-329.

Chotani G., Dodge T., Hsu A., Kumar M., LaDuca R., Trimbur D., Weyler W., Sanford K. (2000). The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim Biophys Acta.*, 1543:434-455.

Cicero AFG., Derosa G., Gaddi A. (2004). What do herbalists suggest to diabetic patients in order to improve glycemic control? Evaluation of scientific evidence and potential risks. *Acta Diabetol.*, 41:91-98.

Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Guegeun M., Vernoux JP. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait.*, 83:269-306.

Converti BA., Dominguez JM., Perego P., da Silva SS., Zilli M. (2000). Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. *Chem Eng Technol.*, 23: 1013-1020.

Cui F., Li Y., Wan C. (2011). Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour Technol.*, 102:1831-1836.

D

De Felice MS. (2004). Prickly pear cactus, *Opuntia* spp: A spine-tingling tale. *Weed Tech.*, 18: 869-877.

De Man JC., Rogosa M., Sharpe ME. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *J App Bacteriol.*, 23:130-135.

De Vuyst L., Leroy F. (2007). Bacteriocins From Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, And Food Applications. *J mol Microbiol biotechnol.*, 13:194-199.

Dehbi F., Hasib A., Ouatmane A., Elbatal H., Jaouad A. (2014). Physicochemical Characteristics of Moroccan Prickly Pear Juice (*Opuntia ficus indica* L.). *Int J Emerg Technol Adv Eng.*, 4:300-306.

Delgenes J., Moletta R., Navarro J.(1996). Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme microb technol.*, 19:220-225.

Dey P., Pal P. (2012). Direct production of L(+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *J Membr Sci.*, 389:355-362.

Dien BS., Nichols NN., Bothast R. J. (2001). Recombinant *Escherichia coli* engineered for the production of l-lactic acid from hexose and pentose sugars. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 27:259-264.

Dietrich C., Nato A., Bost B., Le Marechal P., Guyonvarch A. (2009). Regulation of ldh expression during biotin-limited growth of *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology.*, 155:1360-1375.

Djukic´-Vukovic´AP., Mojovic´ LV., Vukašinovic´-Sekulic´ MS., Rakin MB., Nikolic´ SB, Pejin JD., Bulatovic´ ML. (2012). Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage. *Food Chem.*, 134:1038-1043.

Djukić-Vuković A., Mojović L., Nikolić S., Pejin J., Kocić-Tanackov S., Mihajlovski K. (2013). Distillery stillage as a new substrate for lactic acid production in batch and fed-batch fermentation. *Chem Eng Trans.*, 34:97-102.

Dok-Go H., Lee KH., Kim HJ., Lee EH., Song JLY., Lee YH., Jin C. (2003). Neuroprotective effects of antioxidative flavonoid, quercetin, (1)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Brain Res.*, 965:130-136.

Dortu C., Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires . *Biotechnol Agron Soc Environ.*, 13:143-154.

Drouault S., Corthier G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet Res.*, 32:101-117.

Dubois M., Gilles KA., Hamilton JK., Rebers PA., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.*, 28:350-356.

E

Eggeling L., Bott M. (2005). Handbook of *Corynebacterium Glutamicum* A CRC title, Taylor & Francis group, the academic division of T&F Informa plc. pp. 10-12.

Eiteman MA., Ramalingam S. (2015). Microbial production of lactic acid. *Biotechnol Lett.*, 37:955-972.

El-Mostafa K., El Kharrassi Y., Badreddine A., Andreoletti P., Vamecq J., El Kebbaj MS., Latruffe N., Lizard G., Nasser B., Cherkaoui-Malki M. (2014). Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease. *Molecules.*, 19:14879-14901.

Ennouri M., Evelyne B., Laurence M., Hammadi A. (2005). Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chem.*, 93:431-437.

Ennouri M., Fetoui H., Bourret E., Zeghal N., Attia HH. (2006). Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. *Bioresour Technol.*, 97:1382-1386.

F

Felker P., Rodriguez SC., Casoliba R.M., Filippini R., Medina D., Zapata R. (2005). Comparison of *Opuntia ficus-indica* varieties of Mexican and Argentine origin for fruit yield and quality in Argentina. *J Arid Environ.*, 60:405-422.

Feugang JM., Konarski P., Zou D., Stintzing FC., Zou C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Front Biosci.*, 11:2574-2589.

Fitzpatrick JJ., Ahrens M., Smith S. (2001). Effect of Manganese on *Lactobacillus casei* Fermentation to Produce Lactic Acid from Whey Permeate. *Process Biochem.*, 36:671-675.

Fitzpatrick JJ., O'Keeffe U. (2001). Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. *Process Biochem.*, 37:183-186.

Flores-Albino B., Arias L., Gómez J., Castillo A., Gimeno M., Shirai K. (2012). Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess Biosys Eng.*, 35: 1193-1200.

Florou-Paneri P., Christaki E., Bonos E. (2013). Additional information is available at the end of the chapter Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients, licensee InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/47766>.

Foucaud C, Francois A., Richard J. (1997). Development of a chemically defined medium for the growth of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol.*, 63:301-304.

Fugelsang KC., Edwards CG. (2007). Wine microbiology practical applications and procedures. 2nd ed, Springer, New York.

G

Galati EM., Tripodo MM., Trovato A., d'Aquino A., Monforte MT. (2003). Biological activity of *Opuntia ficus indica* cladodes II: Effect on experimental hypercholesterolemia in rats. *Pharm Biol.*, 41:175-179.

Galbe M., Zacchi G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 59:618-628.

Garde A., Jonsson G., Schmidt A., Ahring B. (2002). Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour Technol.*, 81:217-223.

Ghaffar T., Irshad M., Anwar Z., Aqil T., Zulifqar Z., Tariq A., Kamran M., Ehsan N., Mehmood S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *J Radiat Res Appl Sci.*,7:222-229.

Gonçalves LMD., Xavier AMRB., Almeida JS., Carrondo MJT. (1991). Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme.*, 13:314-319.

Goupy J. (2001). Introduction aux Plans d'expériences. Dunod. Paris. 303 p.

Goupy J. (2006). Les plans d'expériences. *Revue Modulad.*, 34: 74-114.

Gurrieri S., Miceli L., Lanza C.M., Tomaselli F., Bonomo R.P., Rizzarelli E. (2000). Chemical characterization of Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice. *J Agric Food Chem.*, 48:5424-5431.

Gutierrez-Rivera B., Ortiz-Muniz B., Gomez-Rodríguez J., Cardenas-Cagal A., Gonzalez JMD., Aguilar-Uscanga MG. (2015). Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses “B” in a mixed yeast culture. *Renewable Energy*., 74:399-405.

H

Hadj Sadok T., Aid F., Doumandji A., Bellal M. (2014). Effet du jus de cladodes d'*Opuntia ficus indica* sur la fermentation du lait et la croissance des bactéries lactiques et probiotiques. *Revue « Nature & Technologie ». B- Sci Agr Biol.*, 11:29-40.

Hammes WP., Vogel RF. (1995). The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzappel WH (eds) *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic & Professional. London. pp. 19-54.

Hayek SA., Ibrahim SA. (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Nutr Sci.*, 4:73-87.

Hébert EM., Raya RR., de Giori GS. (2004). Evaluation of Minimal Nutritional Requirements of Lactic Acid Bacteria Used in Functional Foods. *Methods Biotechnol.* pp. 139-150.

Henton DE., Gruber P., Lunt J., Randall J. (2005). Polylactic acid technology. In: Mohanty AK., Misra MM., Drzal LT. (eds) *Natural fibers, biopolymers and biocomposites*. CRC press, Boca Raton, Florida. pp. 527-578.

Heriban V., Sturdik E., Zalibera L. Matus P. (1993). Process and Metabolic Characteristics of *Bacillus Coagulans* as a Lactic Acid Producer. *Appl Microbiol.*, 16:243-246.

Hetényi K., Németh Á., Sevelle B. (2011). Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: second steps in a process improvement. *Chem Eng Process: Process Intensification.*, 50:293-299.

Hofvendahl K., Hahn-Hägerdal B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol.*, 26:87-107.

Huang LP., Jin B., Lant P., Zhou J. (2003). Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *J Chem Technol Biotechnol.*, 78:899-906.

I

Idi A., Eva MS. (2011). Bioethanol from second generation feedstock (lignocellulose biomass). *Interdiscip J Contemp Res Bus.*, 3:919-935.

Ilmen M., Koivurata K., Ruhonen L., Suominen P., Penttila M. (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Appl Environ Microbiol.*, 73:117-123.

Inui M., Kawaguchi H., Murakami S., Vertes AA., YukawaH. (2004). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen deprivation conditions. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 8:243-254.

J

Jana S. (2012). Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) and its utilization for food applications. *J Eng Res Stud.*, 3:60-66.

Jiang T., QiaoH., Zheng Z., Chu Q., Li X., Yong Q., Ouyang J. (2016). Lactic Acid Production from Pretreated Hydrolysates of Corn Stover by a Newly Developed *Bacillus coagulans* Strain. *Journal pone.*, 11:1-13.

Jin YL., Ai HL., Cheng J., Wu MY. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Vet Microbiol.*, 136:314-320.

John RP., Nampoothiri KM. (2008). Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* using nitrous acid mutation for L-lactic acid production. *Survival.*, 24:3105-3109.

John R. P., Nampoothiri K.M., Pandey A. (2008). L(+)-Lactic Acid Recovery from Cassava Bagasse Based Fermented Medium Using Anion Exchange Resins. *Brazil arch boil Technol.*, 51:1241-1248.

John RP., Nampoothiri KM., Pandey A. (2007). Fermentative Production of Lactic Acid from Biomass: An Overview on Process Developments and Future Perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 74:524-534.

K

Kabas O., Ozmerzi A., Akinci I. (2006). Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus india* L.) grown wild in Turkey. *J Food Eng.*, 73:198-202.

Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A et al. (2003). The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J Biotechnol.*, 104:5-25.

Kalliomaki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H., Isolauri E. (2003). Probiotics and Prevention of Atopic Disease: 4-Year Follow-Up of a Randomised Placebo-Controlled Trial. *The Lancet.*, 361:1869-1871.

Kaufman EN., Cooper SP., Budner MK., Richardson GR. (1996). Continuous and simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor. *Appl Biochem and Biotechnol.*, 57-58:503-515.

Kaur M., Kaur A., Sharma R. (2012). Pharmacological actions of *Opuntia ficus indica*: A Review. *J Appl Pharm Sci.*, 02:15-18.

Khalid K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *Int J Biosci.*, 1:1-13.

Khuat HBT., Kaboré A., Olmos E., Fick M., Boudrant J., Goergen JL., Delaunay S., Guedon E. (2014). Lactate production as representative of the fermentation potential of *Corynebacterium glutamicum* 2262 in a one-step process *Bioscience. Biotechnol Biochem.*, 78:343-349.

Klinke HB., Thomsen AB., Ahring BK. (2004). Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 66:10-26.

Komesu A., de Oliveira JAR., da Silva Martins LH., Maciel MRW., Maciel Filho R. (2017). Lactic acid production to purification: A Review. *Bioressources*. 12:4364-4383.

Konings WN., Lolkema JS., Bolhuis H., Van Veen HW., Poolman B., Driessen AJM. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*., 71:117-128.

Kotzamanidis C., Roukas T., Skaracis G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World J Microbiol Biotechnol.*, 18:441-448.

Kuhad RC., Singh A., Eriksson KEL. (1997). Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 57:45-125.

Kumar P., Barrett DM., Delwiche MJ., Stroeve P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind Eng Chem Res.*, 48:3713-3729.

Kwon S., Lee PC., Lee EG, Chang YK, Chang N. (2000). Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme Microbl Technol.*, 26:209-215.

Kyla-Nikkila K., Hujanen M., Leisola M., Palva A. (2000). Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L(+)-lactic acid. *Appl Environ Microbiol.*, 66:3835-3841.

L

Lahtinen S., Ouwehand AC., Salminen S., Von Wright A. (2012). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects*. 4th edn, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA. ISBN 0 978-1-4398-3677-4.

LeBlanc JG., Laino JE., Juarez del Valle M., Vannini V., Van Sinderen D., Taranto MP., Font de Valdez G, Savoy de Giori G, Sesma F. (2011). B-Group Vitamin Production By Lactic Acid Bacteria – Current Knowledge And Potential Applications. *J appl microbiol.*, 111:1297-1309.

Lee B., Hyun JE., Li DW., Moon YI. (2002). Effects of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten stem on gastric damage in rats. Arch Pharm Res., 25:67-70.

Lee YC., Pyo YH., Ahn CK., Kim SH. (2005). Food functionality of *Opuntia ficus-indica* var. cultivated in Jeju Island. J Food Sci Nutr., 10:103-110.

Lei Y., Lei T., Ren X., Pei X., Feng Y. (2008). Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. Biochem Eng J., 39:496–502.

Lenihan P., Orozco A., O’Neil E., Ahmad MNM., Rooney DW., Walker GM. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chem Eng J., 156:395-403.

Leroy F., De Vuyst L. (2004). Lactic Acid Bacteria As Functional Starter Cultures For The Food Fermentation Industry. Trends food sci technol., 15:67-78.

Lin SKC., Du C., Koutinas A., Wang R., Webb C. (2008). Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. Biochem Eng J., 41:128-135.

Lin X., Wang B., Yang G., Gauthier M. (2012). Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. Biomed Scienc, Eng Technol. Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.), InTech. pp. 248-282.

Litchfield JH. (1996). Microbiological production of lactic acid. Adv Appl Microbiol., 42:45-95.

Litchfield JH. (2009). Lactic Acid, Microbially Produced. Appl Microbiol: Industrial. Battelle Memorial Institute, Columbus, OH, USA. pp. 362-372.

Loubiere P., Cocaign-Bousquet M., Matos J., Goma G., Lindley ND. (1997). Influence of end-products inhibition and nutrient limitations on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J Appl Microbiol., 82:95-100.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ.(1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem., 193:265-275.

M

Madzingaidzo L., Danner H., Braun R. (2002). Process development and optimisation of lactic acid purification using electro dialysis. *J Biotechnol.*, 96:223-239.

Malainine ME., Dufresne A., Dupeyre D., Mahrouz M., Vuong R., Vignon MR.(2001). Structure et morphologie des raquettes et des epines du figuier de barbarie. *Phys Chem News.* pp. 126-130.

Malainine ME., Mahrouz M., Dufresne A. (2005). Thermoplastic nanocomposites based on cellulose microfibrils from *Opuntia ficus-indica* parenchyma cell. *Compos Sci Technol.*, 65:1520-1526.

Marković M., Markov S., Pejin D., Mojović L., Vukašinović M., Pejin J., Joković N. (2011). The possibility of lactic acid fermentation in the triticale stillage. *Chem Ind Chem Eng Q.*, 17: 153-162.

Martinez FAC., Balciunas EM., Salgado JM., Dominguez JM., Converti GA., de Souza Oliveira RP. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Technol.* 30:70-83.

Massoud MI., El-Razek AMA. (2011). Suitability of Sorghum bicolor L. stalks and grains for bioproduction of ethanol. *Ann Agri Sci.*, 56:83-87.

Mayo B., Aleksandrak - Piekarczyk T., Fernández M., Kowalczyk M., Álvarez – Martín P., Bardowski J. (2010). Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol Lactic Acid Bacteria Novel Appl.*, ISBN: 978-0-813-81583-1

Meyer NB., McLaughlin JB. (1981). Economic uses of *Opuntia*. *Cactus and Succulent J.*, 53: 107-112.

Meziane M., Dilmi Bouras A., El Hameur H. (2013). Lactic Acid Fermentation of a Diluted Molasses Medium by Two Strains of *Lactococcus lactis* ssp. Immobilized on Pouzzolane and Bone Bovine Conference: ISITES, At Sakarya, Turquie. pp. 774-782.

Milcent S., Carrere H. (2001). Clarification of lactic acid fermentation broths. *Sep Pur Technol.*, 22-23:393-401.

Miller GL. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar. *Ann Chem.* 31:426-428.

Miller JH. (1972). *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mobhammer MR., Stintzing FC., Reinhold C. (2006). Cactus Pear Fruits (*Opuntia* spp.): A Review of Processing Technologies and Current Uses. *J Prof Assoc Cactus Develop.*, 8:1-25.

Moldes AB., Alonso JL., Parajo JC. (2001). Resin selection and single-step production and recovery of lactic acid from pretreated wood. *Appl Biochem Biotechnol.*, 95:69-81.

Mounir M., Atfaoui K., En-Nassiri H., Hamouda A., Harrak H., Delvigne F., Thonart P., Ismaili Alaoui M. (2016). Application des biotechnologies pour la valorisation des produits des oasis Marocaine.... Le 1^{er} Symposium International de l'Agro-écologie Oasienne, Faculté des sciences et techniques d'Errachidia, Erfoud, Maroc.

Mussatto SI., Teixeira JA. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. *Current Research, Technology and education Topics in Applied Microbiology and microbial Biotechnology.* A. Mendez-Vilas (Ed). pp. 897-907.

N

Naidu AS., Bidlack WR., Clemens RA. (1999). Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Crit rev food sci nutr.*, 38:13-126.

Nancib A., Nancib N., Meziane-Cherif D., Boubendir A., Fick M., Boudrant J. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour Technol.*, 96:63-67.

Nancib N., Nancib A., Boudjelal A., Benslimane C., Blanchard F., Boudrant J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresour Technol.*, 78:149-153.

Narayanan N., Roychoudhury PK., Srivastava A. (2004). (L) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electron J Biotechnol.*, 7:167-179.

Navarrete-Bolaños JL., Serrato-Joya O., Botello-Alvarez E., Jimenez-Islas H., Cardenas-Manriquez M., Conde-Barajas E., Rico-Martínez R. (2007). Analyzing microbial consortia for biotechnological processes design. Vol. 1: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, ed. Mendez-Vilas, Formatex, Badajoz, Spain. pp. 437-449.

Naveena BJ., Altaf M., Bhadrappa K., Reddy G. (2004). Production of L (+) Lactic Acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Semi-Solid State Fermentation Using Wheat Bran. *Food Technol. Biotechnol.*, 42:147-152.

Neves AR., Pool WA., Kok J, Kuipers OP., Santos H. (2005). Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - The input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol Rev.*, 29:531-554.

Nobel P., Cavelier J., Andrade J.L. (1992). Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *J Exp Bot.*, 43:641-648.

O

Okino S., Inui M., Yukawa H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 68:475-480.

Olsson L., Hahn-Häig B. (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol.*, 18:312-331.

Ong LK. (2004). Conversion of Lignocellulosic Biomass to Fuel Ethanol - A Brief Review. *The planter.*, 80:517-524.

Orla-Jensen M. (1924). La classification des bactéries lactique. INRA Editions. *Lait.*, 4:468-474.

P

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000 a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour technol.*, 74:25-33.

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000 b). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresour technol.*, 74:17-24.

Park EH., Kahng JH., Lee SH., Shin KH. (2001). An anti-inflammatory principle from cactus. *Fitoterapia.*, 72:288-290.

Payot T., Chemaly Z., Fick M. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme Microb Technol.*, 24:191-199.

Peeva L., Peev G. (1997). A new method for pH stabilization of the lactoacidic fermentation. *Enzyme Microb Technol.*, 21:176-181.

Pejin J Radosavljević M., Mojović L., Kocić-Tanackov S., Djukić-Vuković A. (2015). The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. *Int Food Res.* 73:31-37.

Piga A. (2004). Cactus pear: a fruit of nutraceutical and functional importance. *J Prof Assoc Cactus Develop.*, 6:9-22.

Pimienta Barrios E. (1993b). Vegetable cactus (*Opuntia*). In *Underutilized Crops: Pulses and Vegetables*. Ed J. Williams. London, UK. pp. 177-191.

Poolman B. (2002) Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82:147-164.

Postma PW., Lengeler JW., Jacobson GR. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.*, 57:543-594.

Prieto C., Sáenz C., Silva P, Loyola E. (2009). Balsamic Type Vinegar From Colored Ecotypes of Cactus Pear (*Opuntia Ficus-Indica*). ActaHortic., 811:123-126.

Purwadi R., Taherzadeh MJ., Niklasson C. (2004). Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolyzates by Ca(OH)₂. J Biotechnol., 114:187- 98.

Q

Qi B., Yao R. (2007). Lactic acid production, rice straw. Bioresource., 2:419-429.

Quintero MJE., Acosta ACM., MEJÍA CG., Rios ER., Torres AML. (2012). Lactic acid production via cassava-flour hydrolysate fermentation. Vitae., 19:287-293.

Quinto EJ., Jiménez P., Caro I., Tejero J., Mateo J., Girbés T.(2014). Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. Food Nutr Sci., 5:1765-1775.

R

Ramadan MF., Mörsel JT. (2003a). Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.). Food Chem., 82:339-345.

Ramadan MF., Mörsel JT. (2003b). Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: A good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. Food Chem., 83:447-456.

Randhawa M A., Ahmed A., Akram K. (2012). Optimization of lactic acid production from cheap raw material: sugarcane molasses. Pakistan J Bot., 44:333-338.

Ren J. (2010). Biodegradable poly(Lactic Acid): Synthesis, modification, processing and applications. Beijing, China: Tsinghua University Press, Beijing and Springer. pp. 4-13.

Retamal N., Duran JM., Fernandez J. (1987). Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica* (L.) Miller). J Sci Food Agri., 40:213-218.

Roberto I., Mussatto S., Mancilha I., Fernandes M. (2007). The effects of pH and nutrient supplementation of brewer's spent grain cellulosic hydrolysate for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. J Biotechnol., 131:181-182.

Roukas T., Kotzekidou P. (1996). Continuous production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells in a packed-bed reactor. Food Biotechnol., 10:231-242.

S

Sáenz C. (1995). Food Manufacture and by-products. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta-Barrios E Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Product and Protection Paper., 132: 137-143.

Saenz C. (2000). Processing technologies: an alternative for cactus pear (*Opuntia spp.*) fruits and cladodes. J Arid Environ., 46:209-225.

Sáenz C., Sepúlveda E., Matsuhiro B.(2004). *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. J Arid Environ., 57:275-290.

Salvetti E., Torriani S., Felis GE. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. Probiotics & Antimicro Prot. Springer. DOI 10.1007/s12602-012-9117-8.

Sanders JW., Venerna G, Kok J. (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbiol Rev., 23:483-501.

Sazawal S., Hiremath G., Dhingra U., Malik P., Deb S., Black RE. (2006). Efficacy of Probiotics in Prevention of Acute Diarrhoea: A Meta-Analysis of Masked, Randomised, Placebo-Controlled Trials. Lancet Infect Diseases., 6:374-382.

Schepers A., Thibault J., Lacroix C. (2002). *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. Enzyme Microb Technol., 30:176-186.

Schweizer M. (1997). APB (Aloe Plantes et Beauté). Docteur Nopal, le médecin du bon dieu. Clamecy, Presses de la Nouvelle Imprimerie Laballery Paris, France. 81p. <http://www.science-et-magie.com/archives02num/sm58/5802nopal.pdf>

Sepulveda E., Sáenz C. (1990). Chemical and physical characteristics of prickly pear (*Opuntia ficus indica*) pulp. Rev Agro Techol Alim., 30: 551-555.

Serna Cock L., Rodríguez de Stouvenel A. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. Elect J Biotechnol., 9:40-45.

Sheeladevi A., Ramanathan N. (2011). Lactic Acid Production Using Lactic Acid Bacteria under Optimized Conditions. Int J Pharm Biol Arch., 2:1686-1691.

Sirisansaneeyakul S., Luangpipat T., Vanichsriratana W., Srinophakun T., Chen HH., Chisti Y. (2007). Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. J Ind Microbiol Biotechnol., 34:381-391.

Song AAL, Lionel L A., Erin Lim SH., Raha A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microb Cell Fact., 16:55. DOI 10.1186/s12934-017-0669-x.

Srivastava AK., Tripathi AD., Jha A., Poonia A., Sharma N. (2015). Production, optimization and characterization of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). J food Sci Technol., 52:3571-3578.

Stintzing FC., Herbach KM., Mosshammer MR., Carle R., Yi WG., Sellappan S., Akoh CC., Bunch R., Felker P.(2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. J Agric Food Chem., 53:442-451.

Stintzing FC., Schieber A., Carle R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. Eur Food Res Technol., 212:396-407.

Sun Y., Cheng J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresour Technol., 83:1-11.

T

Taleghani HG., Najafpour GD., Ghoreyshi AA. (2014). Batch and continuous production of lactic acid using *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC 8001). Pak J Biotechnol., 11:1-12.

Tamang JP. (2011). Prospects Of Asian Fermented Foods In Global Markets. 11th ASEAN Food Conference, Bangkok, Thailand.

Taylor ACCK. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Appl Biochem Biotechnol., 56:49-58.

Tejayadi S., Cheryan M. (1995). Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. Appl Microbiol Biotechnol., 43: 242- 248.

Terzaghi BE., Sandine WE. (1975). Improved medium for Lactic Streptococci and their bacteriophages, Appl Microbiol., 29:807-813.

Trachtenberg S., Mayer AM. (1981). Composition and properties of *Opuntia ficus indica* mucilage. Phytochemistry., 20:2665-2668.

V

Valente LMM., da Paixão D., do Nascimento AC., dos Santos PFP., Scheinvar LA., Moura MRL., Tinoco LW., Gomes LNF., da Silva JFM. (2010). Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). Food Chem., 123:1127-1131.

Van Maris AJA., Abbott DA., Bellissimi E., Van den Brink J., Kuyper M., Luttik MAH., Wisselink WH., Scheffers AW., van Dijken JP., Pronk JT. (2006). Pronk Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status Anton van Leeuwenhoek., 90:391-418.

Verardi A., De Bari I., Ricca E., Calabrò V. (2012). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass: Current Status of Processes and Technologies and Future Perspectives. Bioethanol Prof. Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.). In Tech. pp. 95-123.

Vijayakumar J., Aravindan R., Viruthagiri T. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chem Biochem Eng Q.*, 22:245-264.

W

Wallace RS., Gibson AC. (2002). Evolution and systematics. In: *Cacti: Biology and Uses*. Eds: Nobel PS, University of California Press Berkeley-Los Angeles-London. pp.1-21

Wee YJ., Kim JN., Ryu HW. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. *Food Technol Biotechnol.*, 44:163-172.

Wertz JL (2016), Prétraitements de la biomasse lignocellulosique, Val Biom, Laboratoire de Chimie biologique industrielle, Université de Liège-Gembloux Agro-Bio Tech, Laboratoire de Génie biologique, Université catholique de Louvain. 58p.
<https://monprojet.labiomasseenwallonie.be/download/file/fid/553>

Wessels S., Axelsson L., Bech Hansen E., De Vuyst L., Laulund S., Lähteenmäki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci Technol.*, 15:498-505.

Widyastuti Y., Rohmatussolihat, Febrisiantosa A. (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food Nutr Sci.*, 5:435-442.

Wiese J., McPherson S., Odden MC., Shlipak MG. (2004). Effect of *Opuntia ficus indica* on symptoms of the alcohol hangover. *Arch Int Med.*, 164:1334-1340.

X, Y

Xiao L., Wang B., Yang G. Gauthier M. (2012). Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications. *Biomed Sci Eng Technol. InTech Open.*, 247-282. DOI: 10.5772/23927.

Yang L., Lu M., Carl S., Mayer JA., Cushman JC., Tian E., Lin H. (2015). Biomass characterization of Agave and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks. *biomass bioenergy.*, 76:43-53.

Yoo IK., Ghang HN., Lee EG., Chang YK., Moon SH. (1997). Effect of B Vitamin Supplementation on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei*. *J ferment bioeng.*, 84:172-175.

Z

Zhang N., Wang Q., Ren J., Wang L.(2009). Preparation and properties of biodegradable poly (lactic acid)/ poly (butylene adipate-co-terephthalate) blend with glycidyl methacrylate as reactive processing agent. *J Mater Sci.*, 44:250-256.

Zhang Z Y., Jin B., Kelly JM. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochem Eng J.*, 35:251-263.

Zhao K., Qiao Q., Chu D., Gu H., Dao TH., Zhang J., Bao J. (2013). Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresour Technol.*, 135:481-489

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/320076675>

Prickly pear cactus as a raw material for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Article · September 2017

CITATION

1

READS

96

4 authors, including:



Aicha Nancib

F.A University

13 PUBLICATIONS 307 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Nabil Nancib

20 PUBLICATIONS 415 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Joseph Boudrant

French National Centre for Scientific Research

85 PUBLICATIONS 1,388 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



At the moment, I am Emeritus, so retired, but in fact I continue with mainly the activity of Editor in Chief of the international journal *Process Biochemistry* [View project](#)



Lactic acid production from sawdust [View project](#)



Prickly pear cactus as a raw material for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Milouda Tamine¹, Aicha Nancib^{1*}, Nabil Nancib¹ and Joseph Boudrant²

¹Laboratory of Applied Microbiology, Ferhat Abbas University, Setif 1, Algeria.

²Laboratory Reactions and Process Engineering (LRPE), UMR CNRS 7224, University of Lorraine, ENSAIA, Vandoeuvre Cedex, 54505, France.

Email: nancibaicha@yahoo.fr

Received 24 May 2017; Received in revised form 17 June 2017; Accepted 17 June 2017

ABSTRACT

Aims: In recent years, microbial conversion of renewable raw materials has become an important objective in industrial biotechnology. Wastes from *Opuntia ficus indica* (*OFI*) can be considered as potential renewable raw materials in lactic acid production. In this study, the feasibility of lactic acid production using fruits and cladodes of *OFI* as carbohydrate feedstock was investigated.

Methodology and results: Response surface methodology (RSM) based on central composite design (CCD) was used to evaluate the effects of fermentation parameters for lactic acid production from *OFI* fruits by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain, isolated from Algerian raw camel milk. Acid hydrolysis of the *OFI* cladodes biomass was performed by dilute H₂SO₄ pretreatment. Lactic acid production from *OFI* fruits was analyzed using response surface methodology. Variables such as inoculum age and reducing sugars concentration were found to significantly influence lactic acid production. Final lactic acid concentration and productivity attained under optimum fermentation conditions were 32.5 g/L and 0.74 g/L.h, respectively. The cladodes of *OFI* are a potential biomass feedstock for lactic acid production. The maximum lactic acid and volumetric productivity were 16.85 g/L and 0.65 g/L.h, respectively.

Conclusion, significance and impact of study: Wastes from *OFI* can be a good feedstock for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The methodology as a whole proved to be quite adequate for the design and optimization of the process. The experimental results also demonstrated the feasibility of using *OFI* cladodes hydrolysate as a substrate for lactic acid production.

Keywords: *Opuntia ficus indica*, acid hydrolysis, lactic acid, fermentation, response surface methodology

INTRODUCTION

Lactic acid (2-hydroxypropanoic acid), CH₃CHOHCOOH is a natural organic acid with a wide range of applications in food, pharmaceutical and cosmetics industries (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). It can be obtained either by the action of fermentative microorganisms or chemical synthesis. The chemical synthesis results in a racemic mixture of the two isomers (D(-) lactic acid and L(+) lactic acid), while the fermentation process can yield an optically pure form of lactic acid or racemate, depending on microorganisms, substrates and fermentation conditions employed in the production process (Zhang *et al.*, 2007).

The cost and availability of the substrate are the most important issues relevant to the conversion of carbohydrates to lactic acid. Application of agro-industrial wastes in bioprocesses provides an alternative way to replace the refined and costly raw materials. Hence, research efforts are focused on seeking new and effective

nutritional sources and new progressive fermentation techniques, enabling the achievement of both high substrate conversion and high production (Bulut *et al.*, 2004). Cheap raw materials, such as molasses (Umar *et al.*, 2012), whey (Panesar *et al.*, 2010), wheat (Gonzalez *et al.*, 2016), date waste (Nancib *et al.*, 2015), artichokes (Shi *et al.*, 2012), sugarcane bagasse (Van der Pol *et al.*, 2016) and even wood (Buyondo and Liu, 2011) have been used for lactic acid production. An alternative to these widely sources is Prickly pear cactus (*Opuntia ficus indica*).

Opuntia ficus indica (*OFI*) is a member of the Cactaceae family and is an important forage crop for livestock in many arid and semi-arid regions of the world. This plant singled out as a relevant health promoting food with a great number of potentially active nutrients, the fairly high sugar content and low acidity of the fruit makes it very susceptible to microbial invasion, thus limiting its

*Corresponding author

storage life in the fresh state (Sepulveda and Saenz, 1990; Joubert, 1993). *OFI* are used for manufacturing juices, jams, jellies, pickles, candied nopales, alcoholic beverages and bioethanol (Kuloyo *et al.*, 2014; Saenz, 2002; Retamal *et al.*, 1987). In fact, the fruits and cladodes contain large amounts of sugars, and also contain proteins, dietary fiber, phytochemical contents, lipids, mineral elements and some vitamins (Jana, 2012; Alimi *et al.*, 2013; Stintzing *et al.*, 2001; Kabas *et al.*, 2006), making its juice particularly suitable as fermentation substrates. Because of its high adaptation to the harsh desert environment and its different applications, the *Opuntia ficus-indica* (*OFI*) is an important and abundant potential raw material for the Algerian industry. Efforts are currently made to develop the fruit production and to discover new applications in the food industries. Due to the high productivity of biomass, cladodes represent a cheap and suitable substrate for the production of lactic acid. The conversion of this biomass to lactic acid usually requires some form of pre-treatment prior to hydrolysis and fermentation. The present research aimed to investigate the use of the prickly pear wastes as the main raw material for lactic acid production using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. A central composite experimental design was employed in planning the experiment in order to determine which experiment variables affect lactic acid production potential from *OFI* fruits by using RSM and a predictive polynomial quadratic equation. The ability of this strain in using dilute-acid hydrolysate of *OFI* cladodes for lactic acid production was further tested.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Fruits and cladodes of *OFI* were harvested between July and September from the mountainous zone of Setif, East of Algeria.

Extraction of *OFI* fruit sugars

The wastes from the recovered prickly pear fruits were washed and the glochides on the peel surface were removed under running tap water by rubbing. Fruits were

cut longitudinally, the flesh and thick peel were separated, and tap water added at a ratio of two parts of water to one part of fruit pulp. The mixture was heated at 50 °C for 45 min with continuous stirring followed by centrifuging at 4000 rpm for 20 min in order to separate the cellulosic debris, while the supernatant was used essentially as the carbon source in the fermentation medium.

Dilute acid hydrolysis of *OFI* cladodes

The cladodes were washed with running water from the faucet; excess humidity was removed with absorbing paper. The cladodes were cut manually with a knife into small cubes and desiccated for 48 h at 60 °C in a drying oven using cold air current. The dried samples were milled into a powdery form in an analytical grinder for a few minutes and stored at room temperature until further use. Before lactic acid fermentation, the dried cladodes were suspended in 6.8% sulfuric acid at a 10% (w/v) loading, the mixture was heated to 100 °C for 92 min.

Detoxification of acid hydrolysate

To eliminate inhibiting substances from the fermentation medium, the solid residue of acid hydrolysate was separated by centrifugation and the pH of the resulting supernatant was adjusted to 10 using NaOH, filtering, acidifying to pH 5.5 with sulfuric acid, and adding sodium sulfite (1 g/L). The resulting precipitate was centrifuged off and the pH was adjusted to 6.

Media and growth conditions

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (*Lactococcus lactis*) used in this study was isolated from Algerian raw camel milk. The strain was stored in a M17 medium with 20% (v/v) glycerol at -20 °C. The inoculum was prepared by transferring glycerol stock culture (1 mL) to an Erlenmeyer flask containing 100 mL of M17 medium and incubated at 33.5 °C for 6 h (time needed for the microorganism to reach the exponential growth phase) on a rotary shaker at 200 rpm. Then, the culture containing the production medium (*OFI* juice) was inoculated.

Table 1: Characteristics of raw *OFI*.

Characteristics	Water (%)	Protein concentration (%)	Total sugars (%)	Reducing sugars (%)	pH (units)
<i>OFI</i> fruit	85.25 ± 1.39	0.7 ± 0.05	15.2 ± 0.25	13.5 ± 0.30	5.5 ± 0.07
<i>OFI</i> cladode	92 ± 1	5.12 ^a ± 0.5	8 ^a ± 1	3.22 ^a ± 0.37	5.13 ± 0.06

^a % Dry weight

Values represent means ± standard deviation calculated from three determinations

Fermentations were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL cultivation medium. *OFI* juice (*OFI* fruit juice or *OFI* cladode hydrolysate) was used essentially as the carbon source in the fermentation medium. Table 1 summarizes the characteristics of the

raw *OFI* used. The medium for the cultures has the following composition: *OFI* juice; yeast extract, KH₂PO₄ 0.5 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L; MnSO₄·H₂O 0.07 g/L; MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L and CH₃COONa·3H₂O 6 g/L (the solution of nutrients were sterilized separately). The flasks

were inoculated with 10% of seed inoculums and incubated at 33.5 °C on a rotary shaker at 200 rpm. The pH of the medium was adjusted to 6. A central composite design (CCD) was used in the optimization of lactic acid production from OFI fruit juice. Experiments were replicated three times. All the media were sterilized at 121 °C for 20 min.

Table 2: Levels of variables used in the experimental design.

Variables	Codes	Levels				
		-α	-1	0	+1	+α
Reducing sugars OFI fruit (g/L)	X_1	33.18	40	50	60	66.82
Yeast extract (g/L)	X_2	6.63	8	10	12	13.36
Inoculum age (h)	X_3	4.63	6	8	10	11.36

$\alpha=1.682$

The experimental data obtained from the CCD model can be represented with the following equation:

$$Y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad [\text{Eq. 1}]$$

Where Y_i is the predicted response, X_i and X_j are the independent variables in the model, k is the number of independent variables, β_0 is the intercept (constants and regression coefficients of the model), β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the quadratic coefficient and β_{ij} is the interaction coefficient. Multivariate regression analysis with model equation 1 (Eq. 1) was carried out on the data to yield equation 2 (Eq. 2) which was used to optimize the product responses.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad [\text{Eq. 2}]$$

The graphical representation of these equations are called response surfaces, which was used to describe the individual and cumulative effects of the test variables on the response and to determine the mutual interactions between the test variables and their subsequent effect on the response. The probability values (*P-values*) indicate the significance of each of the coefficient, which in turn governs the patterns of interactions between the variables. The quality of fit of the second-order equation was expressed by the coefficient of determination R^2 , and its statistical significance was determined by the F-test. The coefficients of the equation were determined by employing MINITAB 16 software (Minitab Inc, State College, PA - www.minitab.com) and the analysis of variance (ANOVA) test was performed to assay the statistical significance of the analysis.

Analytical methods

The total sugars in OFI juice were determined by the phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) and reducing sugars content were determined by the colorimetric method using the UVVis spectrophotometer, (Spectronic Genesis 20) at 540 nm using 3, 5- dinitrosalicylic acid (DNS reagent) with glucose as standard (Miller, 1959).

Experimental design and statistical analysis

The central composite design (CCD) was used to evaluate the effects of three independent variables: reducing sugars concentration of OFI fruit (X_1), yeast extract concentration (X_2) and inoculum age (X_3). For an optimized procedure, the variables selected were prescribed into five levels, coded as $-\alpha$, -1, 0, +1 and $+\alpha$, as presented in Table 2.

Glucose was measured using an enzymatic kit (Glucose PAP SL, Elitech). The protein concentrations were determined using the Lowry method with bovine serum albumin as the standard (Lowry *et al.*, 1951). The moisture content of the raw OFI was estimated according to the AOAC method (2000). Cell growth was monitored spectrophotometrically (Spectronic 20 Genesys) by optical density (OD) measurements at 650 nm, and lactic acid estimation was determined following Taylor method (Taylor, 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Lactic acid production from OFI fruit

Optimization of the culture conditions

Table 3 shows the predicted lactic acid value obtained from central composite design with corresponding values observed. The polynomial model for lactic acid concentration is shown below:

$$Y \text{ (g/L)} = 29.98 + 2.01X_1 + 1.16X_2 + 2.56X_3 - 2X_1^2 - 2.29X_2^2 - 1.8X_3^2 + 0.19X_1X_2 + 1.39X_1X_3 + 1.53X_2X_3 \quad [\text{Eq. 3}]$$

The fit validity of the model was checked using the determination coefficient (R^2). The values of the determination coefficients, R^2 and adjusted R^2 which measure the model fitting reliability, were calculated and obtained as 0.91 and 0.82, respectively. This suggests that approximately 91% of the variance is attributed to the variables, which indicate the high significance of the model, where only 9% of the total variations cannot be explained by the model. Confirmation of the adequacy of the regression model was reflected also by the good agreement between the experimental and the predicted values of the response variables as shown in Table 3, where the experimental lactic acid concentration ranged from 19.49 to 32.42 g/L and the corresponding predicted values were 20.13 and 29.98 g/L, respectively.

Pareto chart was used in this work for easier visualization of the main and interaction effects of the

Table 3: Central composite design matrix showing real values along with experimental and predicted values of lactic acid concentration.

Run	Reducing sugars (g/L)	Yeast extract (g/L)	Inoculum age (h)	Lactic acid concentration (g/L)	
	X_1	X_2	X_3	Experimental	Predicted
1	60	12	10	31.87	32.73
2	50	13.36	8	26.64	25.45
3	66.82	10	8	29.94	27.7
4	50	10	8	31.59	29.98
5	60	12	6	20.04	21.75
6	50	10	11.36	29.39	29.19
7	40	12	10	25.54	25.54
8	50	10	8	29.12	29.98
9	40	12	6	19.49	20.13
10	60	8	10	26.09	26.97
11	50	10	8	28.43	29.98
12	50	10	8	27.74	29.98
13	50	6.63	8	22.52	21.54
14	60	8	6	20.59	22.11
15	40	8	10	20.73	20.54
16	40	8	6	20.59	21.25
17	50	10	8	32.42	29.98
18	50	10	4.63	22.52	20.55
19	50	10	8	30.22	29.98
20	33.18	10	8	20.87	20.93

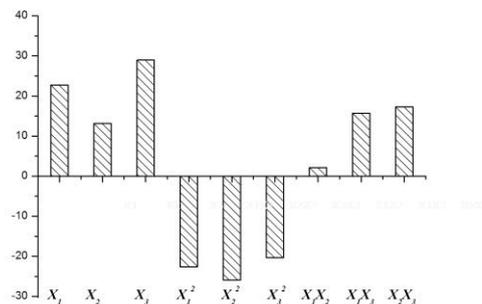


Figure 1: Pareto chart showing the effects of different independent variables on lactic acid concentration

factors to the response variable, that is, lactic acid concentration (Figure 1).

The model identified that within the studied range of experiments the inoculum age (X_3) has the highest positive impact on the fermentation process followed by the reducing sugars (X_1), interactive effect of yeast extract concentration and inoculum age (X_2X_3), interactive effect of reducing sugars concentration and inoculum age (X_1X_3), interactive effect of reducing sugars concentration and yeast extract concentration (X_1X_2), in a decreasing order. While the yeast extract has a slight positive impact on the lactic acid concentration, its quadratic effect (X_2^2)

has the highest negative impact on the fermentation process, followed by the negative quadratic effect of reducing sugars concentration (X_1^2) and inoculum age (X_3^2).

As shown in Table 4, a model *F-value* of 10.87 and a probability value of 0.000 imply significant model fit. The Lack of Fit *F-value* of 1.13 implies that there is insignificant lack of fit. The *P-value* of 0.447 for lack of fit implies that there is only 44.7% chance that the Lack of Fit *F-value* could occur due to noise. From the *P-values* of each model term (Table 4), it can be concluded that, the quadratic coefficients (X_1^2 , X_2^2 and X_3^2) and linear

coefficients (X_1 and X_3) are the most significant coefficient ($p < 0.01$). The optimum level of each variable and the effect of their interactions on lactic acid production as a function of two variables were studied by plotting three-dimensional response surface curves (while keeping the other variables at central point). Graphical representation of response surfaces shown in Figures 2A-2C aided the visualization of the effects of the different variables on lactic acid production. The interactive effect of reducing sugars OFI fruit concentration and yeast extract concentration on lactic acid production at a constant inoculum age of 8 h is shown in Figure 2A. An increase in the reducing sugars with yeast extract concentration up to the optimum point (near of the central levels) increased

the lactic acid to a maximum level and a further increase in the reducing sugars OFI fruit with yeast extract concentration caused the trend to be reversed. The effect of reducing sugars OFI fruit and inoculum age on the lactic acid production is presented in Figure 2B. An increase in reducing sugars OFI fruit with an increase in inoculum age resulted in an increase in lactic acid concentration. The optimal range for lactic acid production was from 45 to 50 g/L of reducing sugars OFI fruit and from 6 to 6.8 h of inoculum age. Figure 2C shows the effect of yeast extract concentration and inoculum age on lactic acid production. The trend observed indicates that lactic acid production was favored at high inoculum age with yeast extract near the central level.

Table 4: ANOVA for response surface quadratic model obtained from experimental designs.

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean Squares	F-Value	P-Value ($P > F$)
Model	9	349.41	38.82	10.87	0.000
X_1	1	55.35	55.35	15.50	0.003**
X_2	1	18.44	18.44	5.16	0.046*
X_3	1	90.08	90.08	25.23	0.001**
X_1^2	1	39.01	39.01	10.87	0.002**
X_2^2	1	64.99	64.99	18.44	0.001**
X_3^2	1	47.02	47.02	13.17	0.005**
X_1X_2	1	0.29	0.28	0.08	0.782
X_1X_3	1	15.51	15.51	4.34	0.064*
X_2X_3	1	18.72	18.72	5.24	0.045*
Residual Error	10	35.71	3.57		
Lack of fit	5	18.97	3.79	1.13	0.447
Pure Error	5	16.74	3.35		
Total	19	385.12			

** Significant at 1% level

* Significant at 5% level

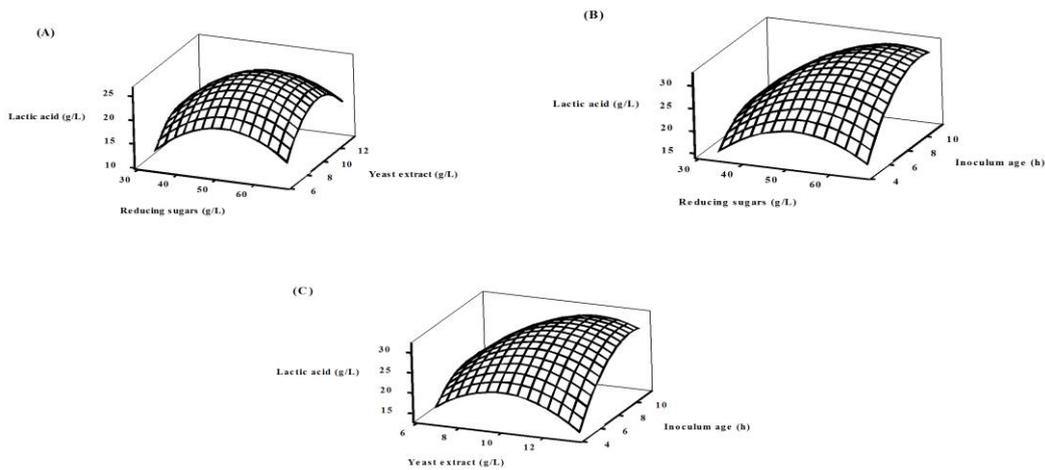


Figure 2: Three-dimensional surface plots showing the effect of different variables on lactic acid production (A) Effect of reducing sugars OFI fruit and yeast extract (B) Effect of reducing sugars OFI fruit and inoculum age (C) Effect of yeast extract and inoculum age.

Validation of the model

To evaluate the validity of the quadratic model, the optimal medium conditions, namely, 60 g/L initial reducing *OFI* fruit juice sugars, 11 g/L yeast extract and 10 h inoculum age were used. The profile of growth, lactic acid production, and fruit *OFI* sugar utilization is shown in Figure 3. Consequently, as shown in this figure, the

consumption of *OFI* fruit juice sugars increased with time of fermentation, and about 60% was consumed at the end of fermentation. Maximum yield, ($[P]/[S \text{ consumed}]$), was obtained as 96% and the productivity equal to 0.74 g/L.h. The maximum production of lactic acid obtained was 32.5 g/L, which is in good agreement with the predicted value (33 g/L), thus confirming the model's authenticity.

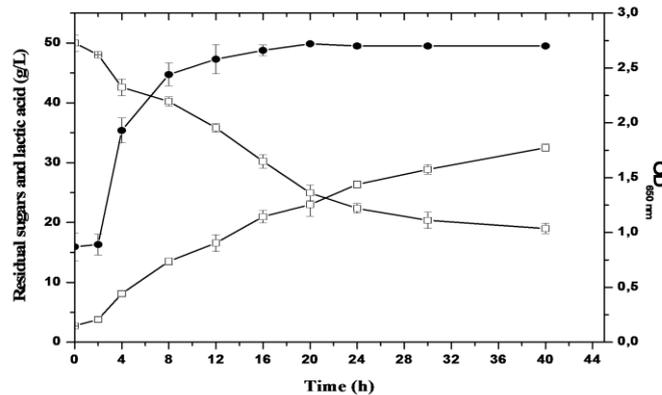


Figure 3: Kinetics of growth (●), sugars consumption (▲), and lactic acid production (□) by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* at optimized conditions. Error bars indicate the standard deviations from three independent experiments

Note that with the initial used medium *OFI* fruit juice as a carbon source without supplementation), hence not optimized (data not shown), the obtained lactic acid concentration was 11.87 g/L with lactic acid yield and a productivity of 0.5 g/g and 0.4 g/L.h, respectively.

These results also confirm the importance of prickly pear fruit juice as a potential carbon source for the production of lactic acid.

A similar result was also obtained in a study by Serna Cock and Rodriguez de Stouvenel (2006) using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* for lactic acid production from sugar cane molasses. A maximum lactic acid concentration of 35 g/L was obtained. In another study by Flores-Albino *et al.* (2012), it was reported that the maximum lactic acid production was 19.5 g/L using a strain of *Lactobacillus* sp. B2. Srivastava *et al.* (2015) obtained with cane molasses a maximum concentration of 55.89 g/L using *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025. Coelho *et al.* (2010) reported that the cassava wastewater for the production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* B 103 produced lactic acid of 41.65 g/L after 48 h of fermentation. John *et al.* (2008) reported 40 g/L lactic acid production with a productivity of 0.42 g/L.h from cassava bagasse via genetically modified *Lactobacillus delbrueckii*. Nancib *et al.* (2005) reported 24.8 g/L of lactic acid. These last authors utilized date juice as carbon source (50 g/L of glucose) and yeast extract (10 g/L) as

nitrogen source for lactic acid production with *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B445. During their experiments which were performed in flasks containing date palm waste, maximum concentration of lactic acid with volumetric productivity of 0.62 g/L.h was attained in 40 h. Meziane *et al.* (2013) reported a maximal lactic acid concentration of 15.8 g/L on molasses using *Lactococcus lactis* ssp. and in this latter case, with a much lower yield and productivity (0.10 g/g and 0.11 g/L.h, respectively) compared to our results (0.96 g/g and 0.74 g/L.h).

Lactic acid production from *OFI* cladodes hydrolysate

Since *Lactococcus lactis* could not directly utilize lignocellulose, hydrolysis of *OFI* cladodes by acid treatment was necessary to transform lignocellulosic biomass into fermentable sugars. To determine the optimal condition for hydrolysis, central composite design was applied to investigate the influence of acid concentration and treatment time of *OFI* cladodes on the production of fermentable sugars. The best results were obtained with acid treatment using 6.8% sulfuric acid for 92.4 min (data not shown).

The obstacle for the use of lignocellulosic hydrolysates is the inhibition effect of toxic compounds released during acid hydrolysis process. In addition to the fermentable

sugars, compounds that are toxic to fermentative organisms such as furfural and 5-hydroxymethylfurfural were also produced in this process (Neureiter *et al.*, 2004).

To understand the performance of *Lactococcus lactis* in the *OFI* cladodes acid hydrolysate, the latter was used as a raw material for lactic acid production. In all cases, the initial glucose level of hydrolysate was 12 g/L. The

experimental results are shown in Table 5. The data shows that *Lactococcus lactis* could convert the sugars in hydrolysate into lactic acid. The maximum lactic acid concentration of 6.29 g/L was achieved at 24 h with lactic acid productivity of 0.26 g/L.h. On the other hand, to improve lactic acid production, hydrolysate of cladodes was detoxified and supplemented with yeast extract and salts.

Table 5: Kinetics parameters of lactic acid production on *OFI* juice.

Raw material	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L.h)
<i>OFI</i> fruit juice	32.5 ± 0.61	0.74
Hydrolysate ^a	6.29 ± 0.54	0.22
Hydrolysate ^b	8.97 ± 0.40	0.33
Hydrolysate ^c	13.93 ± 0.50	0.53
Hydrolysate ^d	16.85 ± 0.43	0.65

^a: Cladode hydrolysate without detoxification

^b: Detoxified cladode hydrolysate

^c: Detoxified cladode hydrolysate supplemented with yeast extract

^d: Detoxified cladode hydrolysate supplemented with yeast extract and salts

Values are the average ± standard deviation of three repeated fermentations

The use of the detoxified acid hydrolysate increased the lactic acid production by 42.6%. Furthermore, supplementation of detoxified acid hydrolysate with 5 g/L yeast extract and salts could notably enhance the titer of lactic acid. As can be seen in Table 5, the lactic acid production and productivity were practically threefold higher than that obtained in un-detoxified acid hydrolysate without any supplementation.

It is clear that supplementation with yeast extract and salts gave better results. Lactic acid bacteria (LAB) are known as fastidious micro organisms that cannot grow on simple mineral media supplemented only with a carbon source (Hébert *et al.*, 2004). In addition to carbohydrates, culture media of LAB are usually supplemented with various free amino acids, peptides, nucleic acid derivatives, minerals and vitamins (John *et al.*, 2007). The growth factors are usually provided by nitrogen sources. In particular, yeast extract has the greatest effect due to the presence of purines, pyrimidine and vitamins B (Hujanen *et al.*, 2001 ; Narayanan *et al.*, 2004; Nancib *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008). Indeed, these results show a high lactic concentration in comparison to other previously published studies which mention lower maximum lactic acid concentrations: 10.9 g/L from sugarcane bagasses using *Lactococcus lactis* IO-1 obtained by Laopaiboon *et al.* (2010), 10.6 g/L from sugarcane bagasses using *Lactococcus lactis* TISTER-1401 obtained by Jonglertjunya *et al.* (2012) and about 9 g/L from wheat-straw hemicellulose hydrolysates with mixed culture of *Lactobacillus brevis* and *L. pentosus* obtained by Garde *et al.* (2002).

This high lactic acid concentration was probably related to the composition of cladodes (in sugars, vitamins, fatty acids and amino acids) and to the capacity of *Lactococcus lactis* to metabolize several sugars. Most bacteria have the ability to use a great variety of carbon sources as an evolutionary advantage to be able to adapt

to their ever-changing habitats. Acid cladode hydrolysate contain not only hexoses but also pentoses (Akanni *et al.*, 2014). Hexoses can easily be fermented by LAB, but a few LAB metabolize pentose sugars via the phosphoketolase pathway. Tanaka *et al.* (2002) reported that *Lactococcus lactis* could utilize xylose with a high lactate yield and low acetate production. Passerini *et al.* (2013) investigated the role and adaptation of *Lactococcus lactis* (A12) in sourdough. These authors showed that this strain was able to grow on galactose and L-arabinose. Based on the experimental results of this study, the *OFI* cladodes seemed promising as a lignocellulosic biomass feedstock for lactic acid production.

CONCLUSION

Prickly pear cactus has been revealed as a suitable substrate to lactic acid production by *Lactococcus lactis*. The central composite design and response surface methodology enable the determination of optimal operating conditions suitable for obtaining greater lactic acid production. The validity of the model was proved by fitting the values of the variables in the second order polynomial equation and by actually carrying out the experiment at those predicted values for the three independent variables. Cladodes were also proven to be an economically feasible raw material for lactic acid production.

REFERENCES

Akanni, G. B., du Preez, J. C., Steyn, L. and Kilian, G. C. (2014). Protein enrichment of an *Opuntia ficus-indica* cladode hydrolysate by cultivation of *Candida utilis* and *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **95**, 1094-1102.

- Alimi, H., Hfaeidha, N., Bouonia, Z., Saklyb, M. and Ben Rhoumab, K. (2013).** Ameliorative effect of *Opuntia ficus indica* juice on ethanol-induced oxidative stress in rat erythrocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology* **65**, 391-396.
- AOAC (2000).** Official Methods of Analysis, 17th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA. Broihier, K. (1999). The Phytochemical Renaissance. *Food Processing* **44**, 46-48.
- Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. (2004).** Effect of different carbon sources on L(+) -lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal* **21(1)**, 33-37.
- Buyondo, J. P. and Liu, S. (2011).** Lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* from wood extract hydrolysates. *Journal of Science and Technology for Forest Products and Processes* **1**, 38-47.
- Coelho, L. F., de Lima, C. J. B., Bernardo, M. P., Alvarez, G. M. and Contiero, J. (2010).** Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava wastewater by *Lactobacillus rhamnosus* B 103. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 1944-1950.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.
- Flores-Albino, B., Arias, L., Gomez, J., Castillo, A., Gimeno, M. and Shirai, K. (2012).** Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **35**, 1193-1200.
- Garde, A., Jonson, G., Schmidt, A. S. and Ahring, B. K. (2002).** Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresource Technology* **81**, 217-223.
- Gonzalez, K., Tebbani, S., Lopes, F., Thorigné, A., Givry, S., Dumur, D. and Pareau, D. (2016).** Modelling the continuous lactic acid production process from wheat flour. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 147-159.
- Hébert, E. M., Raya, R. R. and Giori, G. S. (2004).** Nutritional requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a chemically defined medium. *Current Microbiology* **49**, 341-345.
- Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y. and Leisola, M. (2001).** Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRLB-441. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 126-130.
- Jana, S. (2012).** Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) and its utilization for food applications. *Journal of Engineering Research and Studies* **3**, 60-66.
- John, R. P., Gangadharan, D. and Nampoothiri, K. M. (2008).** Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresource Technology* **99**, 8008-8015.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. (2007).** Fermentative production of lactic acid from biomass: An over-view on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 524-534.
- Jonglertjunya, W., Pranrawang, N., Phookongka, N., Sridangtip, T., Sawedrungreang, W. and Krongtaew, C. (2012).** Utilization of sugarcane bagasse for lactic acid production by acid hydrolysis and fermentation using *Lactobacillus* sp. *World Academy of Science, Engineering and Technology* **66**, 173-178.
- Joubert, E. (1993).** Processing of the fruit of five prickly pear cultivars grown in South Africa. *International Journal of Food Science and Technology* **28**, 377-387.
- Kabas, O., Ozmerzi, A. and Akinci, I. (2006).** Physical properties of cactus pear (*Opuntia ficus indica* L.) grown wild in Turkey. *Journal of Food Engineering* **73**, 198-202.
- Kuloyo, O. O., du Preez, J. C., García-Aparicio Mdel, P., Kilian, S. G., Steyn, L. and Görgens, J. (2014).** *Opuntia ficus indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **30**, 3173-3183.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V. and Laopaiboon, L. (2010).** Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource Technology* **101**, 1036-1043.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Meziane, M., Dilmi Bouras, A. and El Hameur, H. (2013).** Lactic acid fermentation of a diluted molasses medium by two strains of *Lactococcus lactis* ssp. immobilized on pouzzolane and bone bovine conference: ISITES, At Sakarya, Turquie **774-782**.
- Miller, G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A. and Boudrant, J. (2015).** The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Brazilian Journal of Microbiology* **46**, 893-902.
- Nancib, A., Nancib, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J. (2005).** Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology* **96(1)**, 63-67.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004).** L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* **7**, 167-179.
- Neureiter, M., Danner, H., Madzingaidzo, L., Miyafuji, H., Thomasser, C., Bvochora, J., Bamusi, S. and**

- Braun, R. (2004).** Lignocellulose feedstocks for the production of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **18(1)**, 55-63.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J. and Kosseva, M. (2010).** Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **53**, 219-226.
- Passerini, D., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné-Faucher, C., Daveran-Mingot, M. L. and Coccagn-Bousquet, M. (2013).** The carbohydrate metabolism signature of *Lactococcus lactis* Strain A12 reveals its sourdough ecosystem origin. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 5844-5852.
- Retamal, N., Duran, J. M. and Fernandez, J. (1987).** Ethanol production by fermentation of fruits and cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **40**, 213-218.
- Saenz, C. (2002).** Cactus pear fruit and cladodes: A source of functional components for foods. *Acta Hort* **581**, 253-263.
- Sepulveda, E. and Saenz, C. (1990).** Características químicas y físicas de pulpa de tuna (*Opuntia ficus indica*). *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **30**, 51-555.
- Serna Cock, L. and Rodriguez de Stouvenel, A. (2006).** Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs. *lactis* isolated from sugar cane plants. *Electronic Journal of Biotechnology* **9**, 40-45.
- Shi, Z., Wei, P., Zhu, X., Cai, J., Huang, L. and Xu, Z. (2012).** Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology* **51**, 263-268.
- Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsriratana, W., Srinophakun, T., Chen, H. H. and Chisti, Y. (2007).** Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**, 381-391.
- Srivastava, A. K., Tripathi, A. D., Jha, A., Poonia, A. and Sharma, N. (2015).** Production, optimization and characterization of lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 from utilizing agro-industrial byproduct (cane molasses). *Journal of Food Science and Technology* **52**, 3571-3578.
- Stintzing, F. C., Schieber, A. and Carle, R. (2001).** Phytochemical and nutritional significance of Cactus pear. *European Food Research and Technology* **212**, 396-407.
- Tanaka, K., Komiyama, A., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Hall, S. J. and Stanbury, P. F. (2002).** Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 160-167.
- Taylor, A. C. C. K. (1996).** A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **56**, 49-58.
- Umar, F., Faqir, M. A., Tahir, Z., Sajjad, U. R., Mouhammd Atif, R., Anwaar, A. and Khashif, A. (2012).** Optimization of lactic acid production from cheap raw material: Sugarcane molasses. *Pakistan Journal of Botany* **44**, 333-338.
- Van der Pol, E. C., Eggink, G. and Weusthuis, R. A. (2016).** Production of L(+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in simultaneous saccharification and fermentation strategy. *Biotechnology for Biofuels* **9**, 248.
- Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, Y. (2008).** Response surface optimization of L(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* GMCC 1466. *Biochemical Engineering Journal* **39**, 496-502.
- Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M. (2007).** Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochemical Engineering Journal* **35**, 251-263.

يهدف هذا العمل لإكشاف إمكانات *Opuntia ficus indica* (OFI) كمادة خام لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. يركز الجزء الأول على استخدام عصير فاكهة OFI كمصدر للكربون لإنتاج حمض اللبن من قبل *Lactococcus lactis* 19435 و *Lactococcus lactis* (Lc20) معزولة من حليب النوق. تم إجراء العديد من عمليات تخمير غير المستمر لغرض دراسة المتطلبات الغذائية لهاتين السلالتين. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن إثراء الوسط الذي أسسه عصير فاكهة OFI بالأحماض المعدنية ومستخلص الخميرة أدى إلى تحسين إنتاج حمض اللبن بنسبة 53.8٪ بواسطة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. تحسن في إنتاج حمض اللبن بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc20) تم تسجيله أيضا بعد إضافة الأحماض المعدنية. في هذه الحالة الأخيرة، الشروط المثلى لإنتاج حمض اللبن التي حددها النموذج composite centré في وسط أساسه عصير فاكهة OFI بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20) هي كالتالي: سكريات مرجحة (60 غ / لتر)، مستخلص الخميرة (11 غ / لتر)، سن اللقاح (10 ساعات). تم اختبار ومقارنة مصادر آزوت مختلفة على هذا الوسط. حيث أظهرت النتائج أن مستخلص الخميرة هو المصدر الأكثر فعالية. ومع ذلك، يبدو أن كبريتات الأمونيوم هو بديل جيد له وذلك من أجل خفض تكلفة إضافة مستخلص الخميرة. الاستخدام الجزئي لمستخلص الخميرة مع اليوريا بالإضافة إلى فيتامينات (ب) يبدو أيضًا طريقة مهمة للحد من إضافة مستخلص الخميرة. وخصص الجزء الثاني لإيجاد القيم المثلى لشروط إمامة سيقان التين الشوكي باستخدام النموذج الإحصائي composite centré وكانت أفضل الشروط التي حددها النموذج هي: حمض الكبريت (6.8 ٪)، وقت ما قبل المعالجة (92.4 دقيقة).

أما الجزء الثالث فقد خصص لاستخدام حلامة سيقان التين الشوكي كمصدر كربون لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20) وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن هذه الحلامة ملائمة لنمو وإنتاج حمض اللبن. إضافة $CaCO_3$ ، خلاصة الخميرة والأملاح المعدنية للوسط الذي أسسه هو حلامة سيقان التين الشوكي حسنت إنتاج حمض اللبن بنسبة 20.4 ٪. كما أظهرت النتائج أيضا أن كبريتات الأمونيوم يمكن أن تكون بديلا ممكنا لمستخلص الخميرة. إزالة السموم من الحلامة الحمضية بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم وإضافة خلاصة الخميرة والأملاح المعدنية ساعد على تحسين إنتاج حمض اللبن. لتقليل التكلفة مرتبطة بإضافة مستخلص الخميرة. تمت إضافة corn steep إلى الحلامة منزوعة السمية. هذا سمح بالحصول على تركيز لحمض اللاكتيك قريب من ذلك الذي تم الحصول عليه باستعمال مستخلص الخميرة. وبالتالي يمكن أن يحل الـ corn steep محل مستخلص الخميرة كمصدر للأزوت. تمت دراسة إنتاج حمض اللاكتيك على وسط يحتوي على خليط من عصير الفاكهة والحلامة الحمضية لسيقان OFI بواسطة *Lactococcus lactis* (Lc 20). أظهرت النتائج أن إنتاج حمض اللبن الذي تم الحصول عليه بشكل منفصل على عصير الفاكهة أو على الحلامة الحمضية أكبر من ذلك الذي تم الحصول عليه باستعمال الخليط. وخصص الجزء الأخير لإنتاج حمض اللاكتيك على وسط أساسه عصير فاكهة *Opuntia ficus indica* في وسط نقي ومختلط. أظهرت النتائج أن إنتاج حمض اللبن في الوسط النقي أفضل من ذلك المتحصل عليه في الوسط المختلط.

الكلمات المفتاحية: التين الشوكي (*Opuntia ficus indica*)، *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*، التخمر، التحسين، حمض اللبن.

Résumé

L'objectif de ce travail est d'explorer le potentiel d'*Opuntia ficus indica* (OFI) comme matière première pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

La première partie est basée sur l'utilisation du jus de fruit d'OFI en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* 19435 et *Lactococcus lactis* (Lc20) isolé à partir du lait de chamelle. Plusieurs séries de fermentations en mode discontinu ont été réalisées afin d'étudier les besoins nutritionnels de ces deux souches. Les résultats obtenus ont montré que l'enrichissement du milieu à base de jus de fruit d'OFI en sels minéraux et en extrait de levure a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 53,8% par *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 19435. Une amélioration de la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (Lc20) a été également obtenue après ajout des sels minéraux. Dans ce dernier cas, les conditions optimales déterminées par le modèle composite centré sur le milieu à base de jus de fruit d'OFI par *Lactococcus lactis* (Lc 20) sont les suivantes : sucres réducteurs (60 g/l), extrait de levure (11 g/l), âge d'inoculum (10h). Différentes sources azotées ont été testées et comparées sur ce milieu. Les résultats ont montré que l'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace. Cependant, le sulfate d'ammonium semble être une bonne alternative pour réduire le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure. L'utilisation partielle de l'extrait de levure avec l'urée plus les vitamines du groupe B semble aussi une voie intéressante pour réduire l'ajout de l'extrait de levure.

La deuxième partie est consacrée à l'optimisation des conditions d'hydrolyse des cladodes en utilisant le modèle composite centré. Les optima de ces conditions déterminées par le modèle sont : acide sulfurique (6,8%), temps de prétraitement (92,4 mn).

La troisième partie est consacrée à l'utilisation de l'hydrolysate des cladodes en tant que source de carbone pour la production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* (Lc 20). Les résultats obtenus ont montré que l'hydrolysate de cladodes est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique. L'ajout de $CaCO_3$, de l'extrait de levure et des sels minéraux au milieu à base d'hydrolysate enzymatique de cladodes a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 20,4%. Les résultats ont montré également que le sulfate d'ammonium pourrait être un substituant possible de l'extrait de levure.

La détoxification de l'hydrolysate acide par une solution de NaOH et l'ajout de l'extrait de levure et les sels minéraux ont permis d'améliorer la production d'acide lactique. Afin de réduire le coût lié à l'ajout de l'extrait de levure, la liqueur de « corn steep » a été complétée au milieu à base d'hydrolysate acide détoxifié. Ceci a permis d'obtenir une concentration en acide lactique proche de celle obtenue avec l'extrait de levure. La liqueur de « corn steep » pourrait remplacer l'extrait de levure en tant que source azotée.

La production d'acide lactique sur un milieu contenant le mélange de jus de fruit et d'hydrolysate acide des cladodes a été étudiée par *Lactococcus lactis* (Lc 20). Les résultats ont montré que la production d'acide lactique obtenue séparément sur jus de fruit ou bien sur hydrolysate acide des cladodes est supérieure à celle obtenue sur le mélange.

Enfin, la dernière partie est consacrée à la production d'acide lactique sur un milieu à base de jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* en culture pure et mixte. Les résultats ont montré que les performances de production d'acide lactique en culture pure sont meilleures que celles obtenues en culture mixte.

Mots clés: Figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, fermentation, optimisation, acide lactique.