

Etude de comportement de *Lactobacillus acidophilus* dans un milieu à base de jus de betterave (*Beta vulgaris*)

BOUHADI Djilali^{1*}, BENATTOUCHE Zouaoui¹, HARIRI Ahmed¹, BOUALLEM Sid Ahmed² et BELKHODJA Hamza¹.

¹ Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologie et Sécurité Sanitaire, Université de Mascara (UN 2901), BP. 763, Sidi Saïd, 29000, Algérie.

² Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de la Nature et de Vie, Université de Mascara (UN 2901), BP. 763, Sidi Saïd, 29000, Algérie

Abstract. The use of beet juice as substrate for lactic acid production was investigated. *Lactobacillus acodiophilus* as examined as possible production. The analyses of beet juice show that they are rich in sugars and in mineral salts (calcium, potassium, magnesium) but poor in. So this effect, the enrichment of this juice with nitrogen and vitamins is necessary. Of this fact, they constitute the favorable mediums to the development of *Lactobacillus acidophilus*. Fermentation tests were conducted in the laboratory to maximize the production of lactic acid and thus improve the performance of the strain. The results obtained from the fermentation tests show that *Lactobacillus acidophilus* can produce lactic acid on beet juice medium. The results obtained from the fermentation tests show that *Lactobacillus acidophilus* can produce lactic acid on beet juice medium. A maximum production of 18g/l, lactic acid was reached after enrichment beet juice by whey, yeast extract and folic acid.

Keywords: Beet juice, *Lactobacillus acidophilus* - Fermentation, Lactic acid.

Résumé. La production d'acide lactique à partir de jus de betterave par la souche de *Lactobacillus acidophilus* a été étudiée. Les analyses physicochimiques de jus de betterave ont montré que ce dernier présente un milieu riche en sucres et en sels minéraux (calcium, potassium, magnésium) mais pauvre en protéines. A cet effet, l'enrichissement de ce milieu avec de l'azote et des vitamines est nécessaire afin de constituer un milieu favorable au développement de *Lactobacillus acidophilus*. En ce sens, des essais de fermentation ont été menés au laboratoire afin maximiser la production de l'acide lactique et d'améliorer ainsi les performances de la souche. Les résultats obtenus à partir des essais de fermentation montrent que *Lactobacillus acidophilus* peut produire d'acide lactique sur milieu à base de jus de betterave (*Beta vulgaris*). Une production maximale de 21g/l, d'acide lactique a été atteinte après l'enrichissement le jus de betterave par lactosérum, l'extrait de levure et l'acide folique.

Mots clés: jus de betterave, *Lactobacillus acidophilus* - Fermentation, Acide lactique, Biomasse.

* Corresponding author.

E-mail: bouhadidjilali@yahoo.fr (Bouhaddi D.).

Address: University of Université de Mascara, Algeria

1. Introduction

La fermentation bactérienne produit environ 90% de l'acide lactique annuellement dans le monde, le reste étant produit synthétiquement par voie chimique. Actuellement, une grande part de l'acide lactique commercial est produite par des procédés chimiques, ce qui est à l'origine de la pollution de l'environnement. La biotechnologie devient de plus en plus importante dans l'industrie chimique en raison de la nécessité actuelle de diminuer la pollution causée par les approches chimiques, et ceci par le recours aux matières agricoles renouvelables pour en faire des produits utiles. De plus, la production d'acide lactique par des procédés par voie chimique n'est pas adéquate pour une utilisation dans les produits alimentaires et pharmaceutiques (la synthèse chimique donne toujours un mélange racémique d'acide lactique, qui est un inconvénient). Certains clients désirent donc de l'acide lactique «vert» car ils le considèrent comme un ingrédient "Naturel". La production d'acide lactique par fermentation microbienne est un processus qui respecte l'environnement. En effet la production fermentative d'acide lactique offre deux avantages : l'utilisation des hydrates de carbone renouvelables et la production d'acide lactique optiquement pur L(+) ou D(-) selon le type de fermentation choisie. L'acide lactique L(+) est l'isomère préféré dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, industrie du plastique et autres [1]. Récemment, la conversion des matières premières renouvelables en différents produits chimiques est devenue un sujet important de recherche et de développement. Diverses ressources renouvelables comme la cellulose, l'amidon, le blé, le lactosérum et la mélasse ont été employés comme substrats dans la production d'acide lactique [2]. Dans cette optique, on a jugé utile d'utiliser le jus de betterave (*Beta vulgaris*) comme substrat de fermentation pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus acidophilus*. En effet, les betteraves sont riches en sucres qui peuvent être utilisés comme source carbonée de fermentation pour la production de biomasse microbienne.

2. Matériel

2.1. Matériel végétal

Les betteraves utilisés sont achetées et proviennent de la région de Mascara. Les betteraves ont été récoltées au stade de maturité. Afin de sauvegarder la qualité initiale des betteraves, nous avons écartés les betteraves infestées par un triage avant de les conditionner dans des sacs en plastique et des entreposer dans un réfrigérateur 6°C.

2.2. Matériel biologique (Micro-organisme)

Le microorganisme utilisé pour cette étude est la souche Lacteol fort commerciale, disponible sous forme de poudre lyophilisée contenant *Lactobacillus acidophilus* souche Lactéol LB. La formule Lacteol fort 160 mg (correspondant à 6 milliards de *Lactobacillus acidophilus*) est utilisée en traitement symptomatique d'appoint de la diarrhée, en complément de la réhydratation. Avant toute fermentation, la souche se développe préalablement dans le milieu MRS pour 30°C. Après incubation, les nombres de cellules obtenues est $5,1 \times 10^8$ cellules/ml.

2.3. Extraction du jus de Betterave

Les betteraves (*Beta vulgaris*) sont soigneusement lavées, découpées et broyées. Le jus obtenu est centrifugé à 5000 rpm pendant 20 mn afin de séparer les débris celluloses. Après décantation, on récupère le surnageant. On ajuste le pH entre 6 avec NaOH 1N et on le stérilise à 120°C pendant 20 mn pour utiliser comme source de carbone et d'énergie

2.4. Pré-culture

Les inoculations sont réalisées à partir de souches cultivées dans un bouillon d'enrichissement spécifique, le milieu MRS (milieu nutritif mis au point par De Man, Rogosa et Sharpe) [15]. La souche de ferment lactique est réactivée par une pré-culture. Cette fermentation a pour but d'adapter la souche de levure au milieu de culture utilisé. A partir de culture sur gélose MRS inclinée, on prélève deux colonies de chaque tube etensemencé dans des tubes de 10 ml de milieu de culture (MRS). Ensuite les pré cultures sont incubées à 45°C pendant 24heures avec maintien d'agitation. Pour chaque fermentation on réalise plusieurs exemplaires de préculture. Une fois la fermentation lancée, on procède à des prélèvements régulières (toutes les heures), les prélèvements servent au suivie de la biomasse par la mesure de la densité optique (mesure de l'absorbance à 620nm).

2.5. Erlenmeyer

La détermination des paramètres de fermentation (dégradation des sucres, la biomasse et la production maximale d'acide lactique) est réalisée en mode discontinu (batch) en erlenmeyer de 500ml. Les cultures en erlenmeyer sont réalisées avec un volume de travail de 500 ml. Les fioles sont fermées par un bouchon doublé de papier aluminium resserré après chaque prélèvement. C'est la quantité des ferments qui détermine généralement la durée de fermentation lactiques, dans notre cas le taux d'ensemencement est de 10/100.

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

3. Méthodes d'analyses

L'évolution de la biomasse est déterminée par mesure de la densité optique (DO) à 620 nm. La concentration de l'acide lactique est déterminée par titrage de l'acidité avec du NaOH 0.1N. La quantité du sucre consommé durant la fermentation est déterminée par la méthode de Dubois [3].

3.1. Analyse de jus de Betterave

La teneur en eau est déterminée dans une étuve à 105 °C par dessiccation de 10 grammes de jus durant 18 heures. Le pH et l'acidité sont déterminés par les méthodes préconisés par [4]. La teneur en cendres est déterminée par incinération d'un gramme de jus dans un four à moufle à une température de 600 °C durant 3 heures. Les sucres totaux ont été déterminés par la méthode de Dubois, rapporté par [3]. L'azote total est déterminé par la méthode de Kjeldahl qui consiste en une minéralisation de l'échantillon par voie humide par l'acide sulfurique puis distillation et titration avec l'acide sulfurique 0.1 N [5]. Dosage des éléments minéraux, on procède d'abord à une minéralisation d'un ml de jus. Les cendres sont ensuite dissoutes dans 5 ml d'acide chlorhydrique à 20 % et complétée à 50 ml avec l'eau distillée. Ces solutions sont passées au photomètre à flamme et les teneurs en sodium et potassium sont déterminées grâce aux courbes étalons à des courbes étalons.

Afin de maximiser la production d'acide lactique pour *Lactobacillus acidophilus*, trois fermentations on été réalisées :

Culture 1 : Jus de betterave + lactosérum (JB+LS) .

Culture 2 : Jus de betterave + acide folique + extrait de levure (JB+AF+EL) .

Culture 3 : Jus de betterave + acide folique+ lactosérum + extrait de levure (JB+AF+LS+EL)

3.2. Exploitation de la cinétique des résultats

Les différentes analyses effectuées permettant de suivre l'évolution au cours du temps des concentrations des composants présent dans le milieu de culture :

La biomasse: $X(DO) = f(t)$.

Les sucres : $S = f(t)$.

Le métabolite produit (acide lactique) : $P = f(t)$.

Diminution du pH : $pH = f(t)$.

4. Résultats et discussion

4.1. Composition biochimique de jus de Betterave

Tout processus de fermentation est lié à la qualité du milieu de culture utilisé. Par conséquent, la détermination de la composition biochimique des jus de betterave est nécessaire. Les résultats obtenus montrent que les jus betterave présente une teneur en sucres totaux élevée 55g/l (Tableau 1). Par ailleurs, le jus est pauvre en protéines 1.19%. La teneur en matière minérale dans jus de betterave est faible 9,828mg/l expliquée par la provenance géographique de l'échantillon, notamment les conditions climatiques et les caractères édaphiques des sols. Les résultats obtenus montrent que le taux de potassium et calcium nettement supérieures aux besoins. Concernant le pH, le jus de betterave pH légèrement acide variable 5.10, convenable après l'ajustement au développement de *Lactobacillus acidophilus* qui exige un pH de 6.5. Enfin, l'analyse biochimique de jus de betterave permet de dire que ce dernier peut constituer un milieu de fermentation de qualité meilleure pour *Lactobacillus acidophilus*.

Tableau 1 : Les analyses physico-chimiques et biochimiques de jus de betterave.

Constituants	Valeurs
pH	5,10±0.9
Acidité titrable (m.eq)	19±1.2
Sucres totaux (g/l)	55.1±2.01
Matière sèche (%)	23,41±0.89
Protéine (%)	1,19±0.2
Matière minérale (mg/L)	9,82±
Potassium(mg/100g)	612±0.28
Sodium(mg/100g)	310.75±0.9
Calcium(mg/100g)	28±0.6

Tableau 2: Besoins en éléments nutritifs de *Lactobacillus. Acidophilus*

Eléments nutritifs	Besoins par litre de milieu de fermentation
Extrait de viande	10g
Extrait de levure	05g
Tween 80	1ml
Peptone	10g
Phosphate dipotassique	2g
Eau distillée qsq	800ml
Acétate de sodium	5g
Sulfate de magnésium	2g
Sulfate de manganèse	0.005g
Sulfate de magnésium	2g

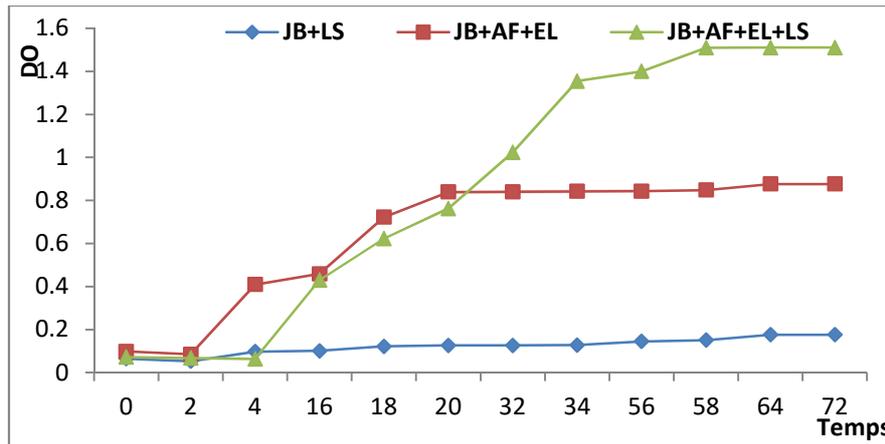


Figure 1: Evolution du DO chez culture de *Lactobacillus acidophilus* en fonction du temps.

La culture *Lactobacillus acidophilus* dans un milieu de culture à base de jus de betterave avec lactosérum a manifesté une croissance très lente avec l'initiation de la phase exponentielle de croissance après 16 heures (figure 1). A l'opposé, la culture de *Lactobacillus acidophilus* en présence de l'acide folique et l'extrait de levure a révélé un début de la phase exponentielle de croissance après 4 heures. L'ajout de l'acide folique et l'extrait de levure provoque une amélioration de la croissance où les concentrations finales de biomasse DO égal 0.15, pour les milieux de cultures respectivement de (JB+LS) et (JB+AF+EL). Plusieurs auteurs ont rapporté que l'ajout des vitamines et l'extrait de levure ont manifesté un effet positif sur la production de la biomasse et d'acide lactique.

[6] a travaillé sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus* cultivée sur lactosérum supplémenté par extrait de levure et il a conclu que les concentrations d'extrait de levure supérieure à 20 g/l deviennent toxiques pour le microorganisme. En plus, [7] ont signalé qu'à des concentrations élevées en extrait de levure, la concentration cellulaire diminue sous l'effet de forte toxicité. [8] ont attribué l'inhibition de la croissance et la production d'acide lactique à des concentrations d'extrait de levure au dessus de 10g/l. En effet, durant la phase exponentielle la bactérie nécessite beaucoup d'énergie pour croître et pour produire l'acide lactique, l'amélioration observée dans la croissance peut être expliquée par la grande exigence de bactérie à l'énergie pour la croissance et la maintenance. En revanche, une petite quantité d'énergie va être destinée à la production d'acide lactique [11].

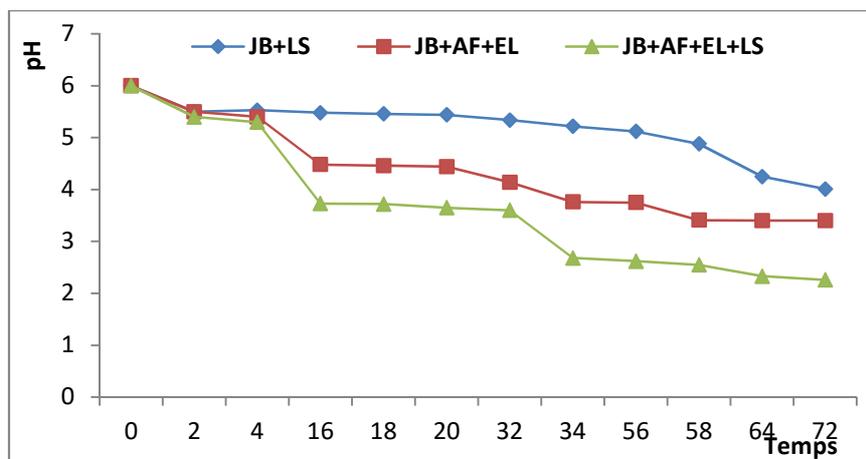


Figure 2: Evolution du pH chez culture de *Lactobacillus acidophilus* en fonction du temps.

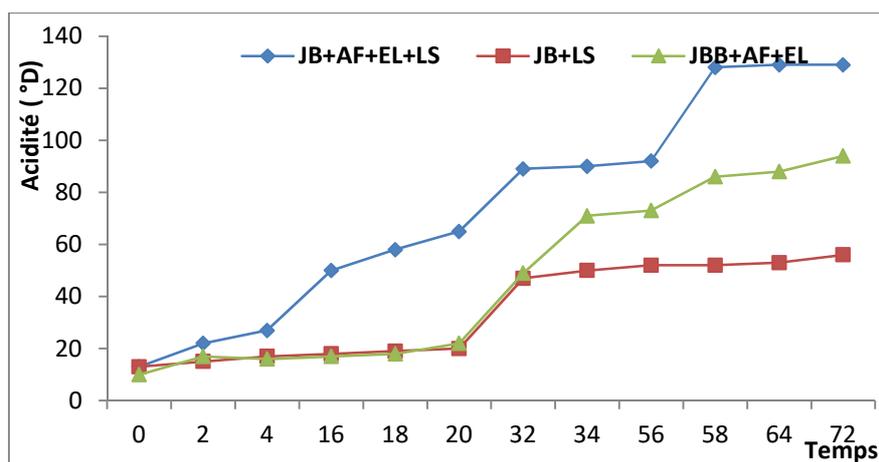


Figure 3: Evolution du lactate en (°D) chez culture de *Lactobacillus acidophilus* en fonction du temps.

D'après les résultats (figure 2) on remarque la diminution des pH des trois fermentations au cours du temps e fermentation (72 heures) surtout pour la culture (JB+AF+LS+EL) ou le la valeur de pH atteint 2.6. La diminution de pH est le résultat de l'acidification du milieu par la souche *Lactobacillus acidophilus* qui produit l'acide lactique comme produit majeur de fermentation.

Plusieurs travaux ont rapporté que la valeur du pH optimum de *Lctobacillus acidophilus* est comprise entre 5.5 et 6.8, ce qui explique la meilleure tolérance des Lacotobacilles vis-à-vis les milieux de culture acide et la production de la biomasse et l'acide lactique chez *Lactobacilles* diminue considérablement à des valeurs de pH inférieur à 4.5.

Les résultats obtenus ont montré que la culture de *Lactobacillus acidophilus* en présence de lactosérum, acide folique et l'extrait de levure une augmentation considérable de la biomasse (DO=1.9), accompagnée avec un taux de l'acide lactique de 135°D (figure 3).

Les travaux de [6] et [9], ont montré que lors de l'accumulation des acides organiques (acide lactique), la valeur de pH du milieu extérieur diminue. Cependant, les bactéries lactiques maintiennent son pH intracellulaire alcalin que le milieu extracellulaire, car la membrane cellulaire est imperméable pour les protons extracellulaires (molécule de lactate) et les cellules excrètent rapidement l'acide lactique dissocié dans le milieu extracellulaire. La différence des valeurs du pH entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire permet la création d'un gradient de pH (ΔpH), qui permet l'excrétion des protons vers l'extérieur. Cependant, à la fin de la phase exponentielle de croissance, la quantité d'ATP disponible devient insuffisantes, le gradient de pH disparaît et les activités d'hexokinasiques baissent et entraînent l'inhibition de la croissance bactérienne [10] et [14].

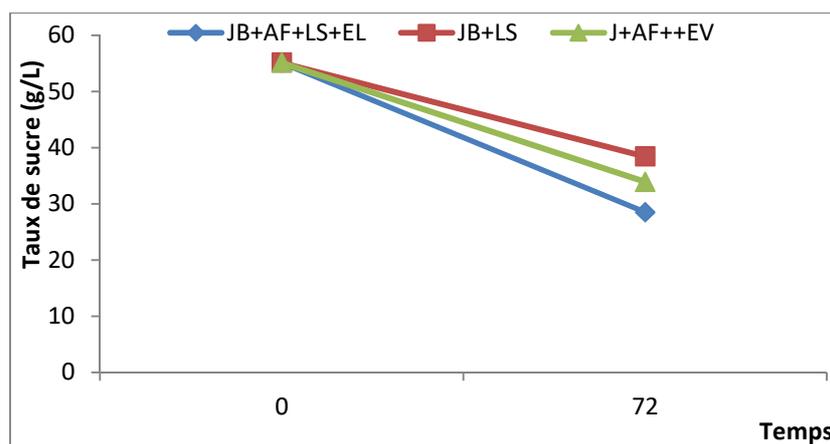


Figure 4 Evolution des sucres résiduels en (g/l) chez culture mixte de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* en fonction du temps.

La consommation des sucres et sa diminution dans le milieu de fermentation (figure 4) indique l'état de santé et du bon déroulement de la fermentation avec une excellente croissance des souches testées [13].

Les résultats obtenus, ont montré que la souche de *Lactobacillus acidophilus* consomme une grande quantité des sucres. Une diminution considérable du taux de sucres est observée chez de *Lactobacillus acidophilus* dans le jus de betterave enrichi par l'acide folique, extrait de levure et lactosérum par rapport aux autres fermentations qui a manifesté une diminution moyenne du début jusqu'au fin de fermentation. La quantité des sucres utilisée dans le milieu (JB+AF+LS+EL) et (JB+AF+EL) est de l'ordre de 27.8, 22.6 g/l respectivement. L'utilisation des sucres chez *Lactobacillus acodophilus* a débuté dès les premières heures de fermentation.

Il apparaît aussi que la croissance et la production d'acide lactique sont inhibées lorsque le pH chute à 4.5 dans le milieu de cultures. Cela est dû à la forte acidité qui résulte de l'accumulation de l'acide lactique [6], a conclu que l'inhibition peut être due à l'épuisement de source carbonée. Mais dans notre travail, ce n'est pas le cas, car la concentration de sucres consommés égale 26.8g/l, donc il reste dans le milieu de culture additionné l'extrait de levure, lactosérum et l'acide folique 28.3g/l des sucres non consommés par la bactérie. Il y a une relation proportionnelle entre la croissance, la consommation de sucres et la production d'acide lactique, c'est ce qui signifie que la souche fermentent les sucres en acide lactique pour tirer l'énergie et l'autre partie de sucre est utilisée pour leurs croissance [12].

4.2. Réalisation du bilan carboné:

Pour vérifier la fiabilité des résultats obtenus nous allons établir le bilan carboné l des trois cultures. Ce bilan nous permet de comparer la quantité de carbone apportée en début de fermentation et la quantité retrouvée à la fin, la différence aurait donc servait à la production de biomasse et de l'acide lactique.

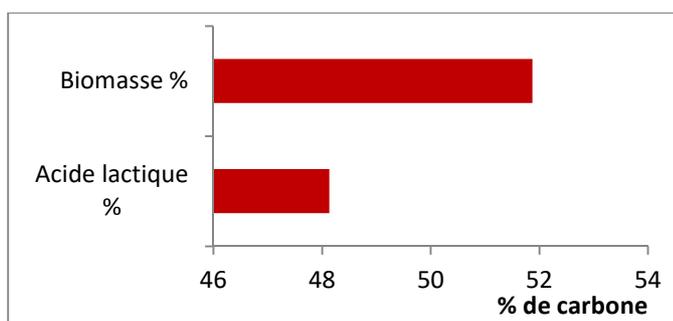


Figure 5: Bilan carboné pour les trois fermentations (JB+AF+EL+LS)

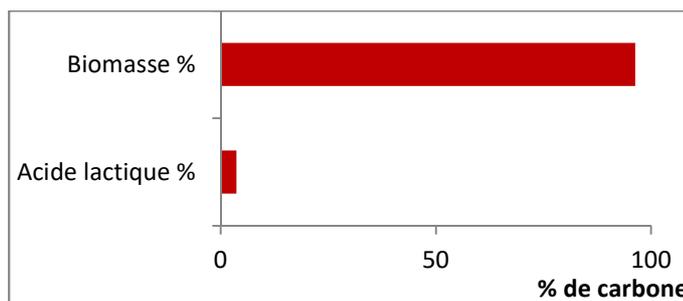


Figure 6: Bilan carboné pour les trois fermentations (JB+AF+LS)

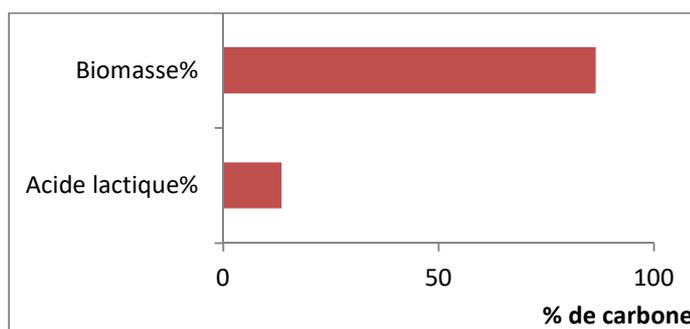


Figure 7: Bilan carboné pour les trois fermentations (JB+LS)

L'analyse du bilan carboné des trois fermentations (figures 5, 6 et 7 témoigne ce qui a été relevé auparavant, que la majorité des sucres consommés sont dirigés vers la production de biomasse et qu'une faible quantité est utilisée pour la production de l'acide lactique.

3.3. Modèle de croissance et de production d'acide lactique

Pour comprendre les phénomènes biologiques et plus précisément les cinétiques de croissance et de production d'acide lactique, on essaiera de traduire les résultats expérimentaux par un modèle mathématique en utilisant un logiciel statistique "Kaleidagraph". La détermination des différents coefficients du modèle polynomial s'est faite par une régression multilinéaire multi variables. La méthode des moindres carrés est utilisée pour calculer le meilleur ajustement aux données. La forme générale de ce modèle est la suivante : $Y = M_0 + M_1X + M_2X^2 + M_3X^3 + M_4X^4$. D'autre part, un lissage des données expérimentales sur la biomasse et production d'acide lactique a été réalisé pour éviter l'interférence des erreurs expérimentales.

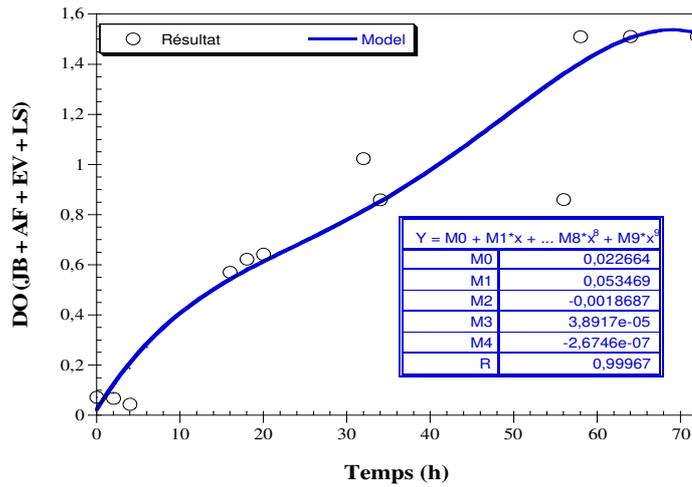


Figure 8: Comparaison des valeurs expérimentales de la densité optique (symboles) et des valeurs calculées (lignes) chez *Lactobacillus acidophilus*.

Le modèle présente une bonne adéquation entre les données expérimentales et les données calculées. Les résultats obtenus ont montré que l'écart est réduit entre les points expérimentaux et les points calculés où le coefficient de corrélation = 0.999 (Figure 8). L'expression mathématique caractérisant l'effet de la composition du milieu optimisé sur la production d'acide lactique est la suivante : $Y=0.0226+0.0534x-0.00186x^2+3.8917 e^{-5}x^3 - 2.674e^{-7}x^4$

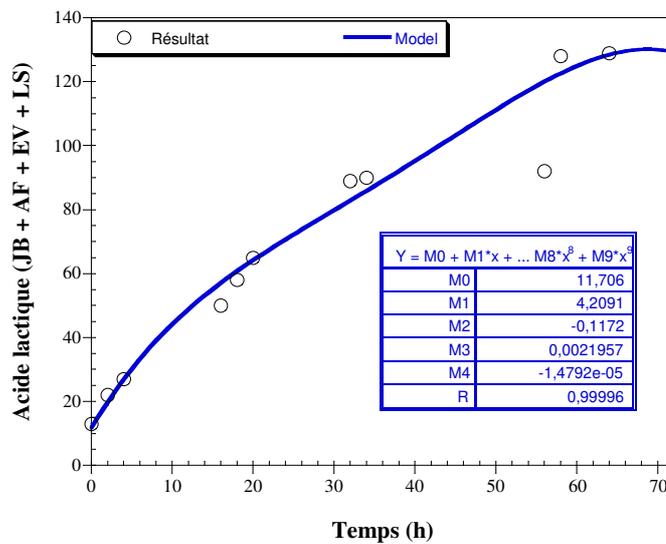


Figure 9: Comparaison des valeurs expérimentales de la l'acidité (symboles) et des valeurs calculées (lignes) chez *Lactobacillus acidophilus*

Le modèle de la production de l'acide lactique illustré dans la (Figure 9) montre que l'ajustement a stimulé de la production durant toutes les phases de croissance avec un coefficient de corrélation R est très élevé (R = 0.9999). Ce qui explique que les points expérimentaux sont en très bon corrélation avec ceux calculés. De ce fait, la quantité d'acide lactique est exprimée par l'équation de troisième degré ci-après : $Y=011.70+4.209x+0.117x^2+0.0021x^3+-1.479e^{-05}$.

5. Conclusion

Le jus de betterave constitue une matière première attractive pour la production d'acide lactique par *Lactobacillus acidophilus*. En effet, la production d'acide lactique par *Lactobacillus acidophilus* en

batch et à pH non contrôlé (pH libre) et dans un milieu enrichi par lactosérum, l'extrait de levure et l'acide folique présente une amélioration marquée de la croissance et de la production d'acide lactique. Néanmoins, l'optimisation des paramètres de production d'acide lactique cultivée sur substrat à base de jus de betterave (*Beta vulgaris*) afin d'améliorer les rendements et la qualité de *Lactobacillus acidophilus* produite est souhaitable.

Comme complément à cette étude, nous recommandons :

- Déterminer précisément le ratio D/L acide lactique
- Utiliser des technologies de fermentations de types procédés continus «fed batch»
- De rechercher des souches plus performantes (locales).
- Travailler avec des souches immobilisées de *Lactobacillus acidophilus* car plusieurs recherches ont montré que la bactérie immobilisée est plus performante qu'une bactérie libre.

Références

- [1] - Reddy G., Altaf Md., Naveena B.J., Venkateshwar M. et Vijay Kumar E. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation -A review, *Biotechnology Advances*, vol. 26, pp.22-34.
- [2] - Nandasana A.D., Kumar S., (2008): Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 38, pp.277–284.
- [3] - 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.
- [4] - Document, A.O.A.C, 'Official Methods of Analysis', Ed. Washington, D.C, 11th, 1970.
- [5] CI. Audigie, J. Figarelle et F. Zonszani, 'Manipulations d'Analyses Biochimiques', Ed. Doin, Paris, pp. 88-97, 1984.
- [6] - Amrane A. (2001). Lactic acid production during the associated and the deceleration growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated in various conditions and media. *Physiology, metabolism. Lait.* 91-103.
- [7] - Ghaly A.E., Tango M.S.A and Dams M.A. (2003). Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. *Agricultural Engineering international. The CIGR J. Scientific research and development.* Vol 5. N° 37.pp.364-369.
- [8] - Levander F and Radstron P. (2001). Requirement for phosphoglucosyltransferase in xopolysaccharid biosynthesis on glucose and lactose using *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* N° 6. (2001).pp.2734-2738.
- [9] - Koning W.N et Otto., (1983). Mécanismes de transport des nutriments dans les bactéries lactiques in : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. Ed Loriga, Lavoisier, 604p.
- [10] - Racine M. et Dumoht J. (1991). Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec. Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en agriculture. N° 302. pp.1-17.
- [11] - Djilali B, Bouziane A, Ahmed H, Kada I, Nawal O. (2012). Study of the Behaviour of *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* in Date Syrup in Batch Fermentation with Controlled pH. *J Biotechnol Biomaterial.* **2**: 129.
- [12] - Pastink MI., Teusink B, Hols P, et al. (2009). Genome-Scale Model of *Streptococcus thermophilus* LMG18311 for Metabolic Comparison of Lactic Acid Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **75**: 3627-3633.
- [13] - Vashishth A, Ganguli A, Tehri N. (2014). Organic acids production from *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* using a novel citrus and potato waste medium. *J Innov Biol.* **1**: 175-180.
- [14] - Nancib A, Nancib N, Boudrant J (1997). Use a waster product in the fermentative formation of Backer's yeast Biomasse by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biores. Technol.* pp. 67- 71.

[15] ISO 20128 / IDF 192. Mai 2006. Produits laitiers. Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présumptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.