

## **PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE SUR JUS DE DATTE EN CULTURE PURE ET MIXTE PAR *LACTOBACILLUS CASEI* ET *LACTOCOCCUS LACTIS***

**Nabil Nancib\*, Aicha Nancib\*, Joseph Boudrant\*\***

*\*Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University Ferhat  
Abbas, Setif, Algeria, E-mail: [nancibnabil@yahoo.fr](mailto:nancibnabil@yahoo.fr)*

*\*\*LSGC-CNRS-ENSAIA, BP 172, Avenue de la Forêt de Haye, 54505  
Vandoeuvre-les-Nancy, France*

**Abstract :** Lactic acid is considered as a very important chemical compound with significant applications in pharmaceuticals, cosmetics and especially in the food industry. New applications, such as degradable plastics made from poly(lactic) acid, have the potential to greatly expand the market for lactic acid, if more economical processes could be developed. Industrial processes for the production of lactic acid typically use sucrose from cane and beet sugar, whey containing lactose and maltose and dextrose from hydrolysed starch. Algeria produces more than 400 different varieties of dates with an annual production of over 300.000 tons. However, about 20 % of the production is lost due to over-ripening and improper handling, processing, and marketing. Dates contain large amounts of reducing sugars, especially glucose, fructose and sucrose at levels of (73 – 83 %) (dry basis). The date also contains protein, lipid, fibre, mineral elements and some vitamins. Thus making date extracts quite suitable as feedstock for fermentation.

Complex mixed cultures have also been used in several fermentation processes, e.g. the production of ethanol, aspartic, and succinic acid from glucose and lactic acid from starch. Mixed cultures have not been used yet

on an industrial scale, because it is difficult to establish optimum culture conditions for both strains for parameters such as nutrient supply, temperature, oxygen demand, pH, etc. Only a few reports concern the production of lactic acid from starch, non-fat dry milk, and whey permeate by mixed cultures in batch fermentation. Lactic acid production from date juice extract by mixed culture of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells has not been investigated.

In this study, date juice was used as substrate for production of lactic acid by single and mixed culture system containing *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. One important parameter in sustaining an economically viable production of lactic acid is the interaction between feedstock and microorganism. The bacteria must be able to convert all the available carbohydrates to lactic acid. All experiments were performed as batch. *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* were incubated at their optimum temperatures of 30 and 38°C, respectively. A temperature of 30°C was used for co-cultivation. In batch culture, the results have shown that the highest concentration of residual date sugar extract was obtained in fermentation with *L. lactis* while the lowest concentration was found in fermentation with mixed cultures of *L. casei* and *L. lactis*. This coincides with lactic acid production. The highest concentration of lactic acid (60 g/l) was obtained in the mixed culture system while in single culture fermentations of *Lactobacillus casei* or *Lactococcus lactis*, the maximum concentration of lactic acid was 53 and 46 g/l, respectively. Our results showed an important aspect of lactic acid production from date juice by single and mixed cultures of *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*. The mixed culture system gave better results than single cultures regarding lactic acid concentration, and sugar utilization. The date juice extract was an attractive medium for the production of lactic acid by single and mixed culture.

**Keywords :** Lactic acid; date juice; *Lactobacillus casei*; *Lactococcus lactis*; mixed cultures.

**Résumé:** La production d'acide lactique à partir de jus de datte en culture pure et mixte de *lactobacillus casei* et *lactococcus lactis* a été étudiée. Les résultats obtenus ont montré que le maximum (60,32 g/l) de production d'acide lactique est obtenue en culture mixte après 19 h de culture alors que durant les cultures pures de *lactobacillus casei* et *lactococcus lactis*, les concentrations en acide lactique maximales sont respectivement 53 g/l et 46,12 g/l. Dans le cas de culture mixte, les quantités de fructose et de glucose utilisées sont respectivement 100 % et 96,12 %.

Ainsi, le système de culture mixte permet d'obtenir une meilleure production d'acide lactique ainsi qu'une meilleure consommation de sucres par rapport à celles obtenues en cultures pures. De plus, le jus de datte constitue une matière première attractive pour ce type de production.

**Mots clés :** acide lactique; dattes; *Lactobacillus casei*; *Lactococcus lactis*; cultures mixtes

## INTRODUCTION

L'acide lactique est un acide organique naturel intéressant, trouve diverses applications courantes dans les industries pharmaceutiques, chimiques, alimentaires (Göksungur et Güvenç, 1997) et trouve également de nouvelles applications potentielles, notamment dans la production de polymères hautement biodégradables (Payot et al., 1999). Actuellement, différentes matières premières sont utilisées industriellement (hydrolysats d'amidon, lactosérum, mélasse de betterave et de canne) pour la production d'acide lactique (Kurosawa et al., 1998 ; Özen et Özilgen, 1992).

L'industrie agro-alimentaire génère d'importantes quantités de déchets. Le secteur phoenicole algérien, en particulier fournit à chaque campagne près de 60 000 tonnes de déchets de datte. Ils proviennent soit directement des palmerais, soit des écarts des stations de conditionnement et sont impropres à la consommation en frais. Ces fruits sont dotés de teneurs élevées en sucre (glucose, fructose et saccharose). Ils contiennent également des protéines, des lipides, des éléments minéraux et des vitamines (Abou-Zeid et al., 1991). Cette richesse, peu exploitée, peut être utilisée en biotechnologie comme substrat de fermentation pour les lactobacilles afin de produire de l'acide lactique.

Par ailleurs, le système de culture mixte a été utilisé dans plusieurs procédés de fermentation tels que la production d'éthanol, d'acide aspartique, d'acide succinique et d'acide lactique. Cependant, ce système n'est pas encore utilisé à l'échelle industrielle à cause des difficultés rencontrées au cours de l'optimisation des conditions de culture pour chaque souche tels que la température, la demande en oxygène, le pH, la composition du milieu, etc. Seulement, peu de travaux concernant la production de l'acide lactique en culture mixte ont été développés sur l'hydrolysats d'amidon et le lactosérum (Vickroy, 1985 ; Atkinson et Mavituna, 1991 ; Roukas et Kotzekidou, 1991). La production d'acide lactique par le système de culture mixte n'a pas encore été réalisée avec la datte.

Ce travail s'inscrit dans ce cadre précis et consiste à utiliser le jus de datte en tant que substrat de fermentation pour la production d'acide lactique en culture pure et mixte en utilisant *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*.

## MATERIEL ET METHODES

### Micro-organismes et conditions de culture

Les souches utilisées lors de ce travail sont *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B445 fournie par DSM (Allemagne) et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 fournie par l'Institut Pasteur.

Avant toute fermentation, les souches se développent préalablement dans le milieu MRS pour *Lactobacillus casei* et le milieu M17 pour *Lactococcus lactis* à une température de 30°C. Après incubation, les nombres de cellules obtenues pour *Lactobacillus casei* et *lactococcus lactis* sont respectivement de  $5,3 \times 10^8$  cellules/ml et  $4,6 \times 10^8$  cellules/ml.

### **Preparation du jus de datte**

Les dattes sont d'abord lavées puis dénoyautées. L'eau est rajoutée à raison de 2 litres par kilogramme de pulpe de datte. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 2 heures. Le jus obtenu est centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulodiques. Le surnageant recueilli est utilisé en tant que source de carbone avant d'être dilué aux proportions convenables.

### **Milieu de production**

Le milieu de production consiste en 1 litre de jus de datte. Le milieu est stérilisé à 121°C pendant 20 min. Après refroidissement, le jus de datte est supplémenté avec l'extrait de levure, 10 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g/l;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,03 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 3 g/l;  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 2 g/l et Tween 80, 1 ml/l (les solutions supplémentées sont stérilisées séparément).

### **Conditions de fermentation**

Toutes les fermentations ont été réalisées en cultures discontinues dans un fermenteur (Biolaphite) de 2 litres avec un volume utile de 1 litre et un taux d'inoculum de 10%. Le fermenteur est équipé avec système de contrôle de température, de pH et d'agitation. La température est contrôlée à 30°C et la vitesse d'agitation à 200 rpm. Le pH est maintenu à 6 par ajout automatique d'ammoniaque 5N. En culture pure, le fermenteur est inoculé avec 100 ml d'inoculum de *Lactobacillus casei* ou de *Lactococcus lactis*. Dans le cas de culture mixte, le fermenteur est inoculé avec 50 ml d'inoculum de chaque culture.

### **Analyses**

Les numérations ont lieu par étalement de dilutions du milieu de fermentation sur boîte de Pétri dans lesquelles est coulé du milieu MRS ou M17 gélosé. Les prélèvements de milieu de fermentation sont dilués en cascade dans l'eau physiologique. Pour chaque dilution, 0,1 ml de suspension est déposé et étalé sur la surface de la gélose. Trois étalements sont réalisés pour chaque dilution. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 48 heures après lesquelles un comptage est effectué. Les boîtes qui présentent entre 30 et 300 colonies sont sélectionnées.

L'échantillon est centrifugé à 15 000 g pendant 10 min et le surnageant récupéré est utilisé pour le dosage de l'acide lactique, du glucose et du fructose. L'acide lactique et les concentrations résiduelles en glucose et en fructose sont analysés par HPLC.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

La production d'acide lactique, l'utilisation du fructose et du glucose à partir de jus de datte en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis* sont montrées sur les Figures 1 - 3. Les cultures pures de *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis* ainsi que les cultures mixtes diffèrent considérablement dans leur capacité de produire de l'acide lactique et leur utilisation du fructose et du glucose.

La Figure 1 montre que la plus grande concentration résiduelle en fructose est obtenue en culture pure avec *Lactococcus lactis*. Par contre, en culture mixte le fructose est complètement consommé. Dans ce cas, les quantités du fructose utilisées en culture pure de *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* et en culture mixte sont respectivement, 94,4, 60,31 et 100 % (Tab. 1).

La plus grande concentration résiduelle en glucose est obtenue en culture pure avec *Lactobacillus casei*, alors la plus faible concentration est obtenue en culture mixte (Figure 2). Dans ce cas, les quantités de glucose utilisées en culture pure de *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* et en culture mixte sont respectivement 82,18, 93,8 et 96,12 % (Tab. 1).

La production d'acide lactique est plus importante dans le cas de la fermentation en culture mixte. La concentration maximale en acide lactique est 60,32 g/l (Figure 3). Dans le cas de cultures pures de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, les concentrations maximales en acide lactiques sont respectivement 53 g/l et 46,12 g/l (Tab. 1).

Après 19 heures de culture, les concentrations cellulaires maximales obtenues en cultures pures de *Lactobacillus casei*, et de *Lactococcus lactis* et en culture mixte sont respectivement  $8,5 \times 10^9$ ,  $7,1 \times 10^9$  et  $1,25 \times 10^9$  cellules /ml.

Tab. 1. Paramètres cinétiques des cultures pures et mixtes de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*

Paramètres cinétiques	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	Culture mixte
Concentration en acide lactique, P (g l <sup>-1</sup> )	53	46.12	60.32
Productivité en acide lactique, $\delta$ (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2.75	2.39	3.16
Vitesse spécifique de production d'acide lactique, qp (g lactic acid cfu <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$3.2 \times 10^{-7}$	$3.3 \times 10^{-7}$	$2.5 \times 10^{-6}$
Yp/f (g acide lactique g <sup>-1</sup> fructose utilisé)	1.32	1.87	1.51
Yp/g (g acide lactique g <sup>-1</sup> glucose utilisé)	1.22	1	1.27
Yx/f (ufc g <sup>-1</sup> fructose utilisé)	$2.13 \times 10^5$	$2.73 \times 10^5$	$0.18 \times 10^5$
Yx/g (ufc g <sup>-1</sup> glucose utilisé)	$1.8 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$0.15 \times 10^5$
Vitesse spécifique d'utilisation du fructose, qf (g fructose ufc h <sup>-1</sup> )	$2.3 \times 10^{-7}$	$1.8 \times 10^{-7}$	$1.6 \times 10^{-6}$
Vitesse spécifique d'utilisation du glucose, qg (g glucose ufc h <sup>-1</sup> )	$2.6 \times 10^{-7}$	$3.3 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-6}$
Pourcentage du fructose utilisé	94.4	60.31	100
Pourcentage du glucose utilisé	82.18	93.8	96.12

Valeurs reportées après 19 heures de fermentation.

L'ensemble de ces résultats a permis de montrer que le système de culture mixte est plus performant que celui des cultures pures: la production d'acide lactique est plus importante, et l'utilisation des sucres est meilleure. Des résultats similaires ont été obtenus par Roukas et Kotzekidou (1998) sur la production d'acide lactique à partir du lactosérum en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*. Ils ont montré que la concentration la plus élevée en acide lactique est obtenue en culture mixte

(22,5 g/l) alors qu'en culture pure de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, les concentrations maximales en acide lactique sont respectivement, 16 g/l et 10,5 g/l.

A partir des résultats présentés dans les figures 1 - 3, plusieurs paramètres cinétiques ont été calculés (Tab. 1). Il en ressort de ces données que durant la culture mixte la concentration d'acide lactique, la productivité, la vitesse spécifique de production d'acide lactique, la vitesse spécifique d'utilisation du glucose et du fructose sont plus élevées que celles obtenues en cultures pures.

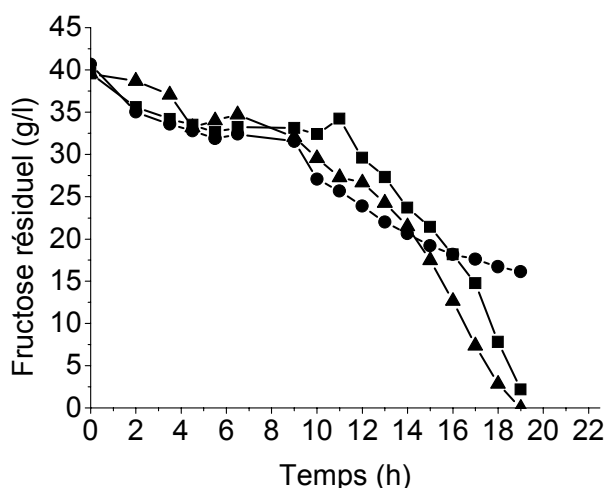


Fig. 1. Utilisation du fructose à partir du jus de datte en culture pure de *Lactobacillus casei* (■), de *Lactococcus lactis* (●) et en culture mixte (▲)

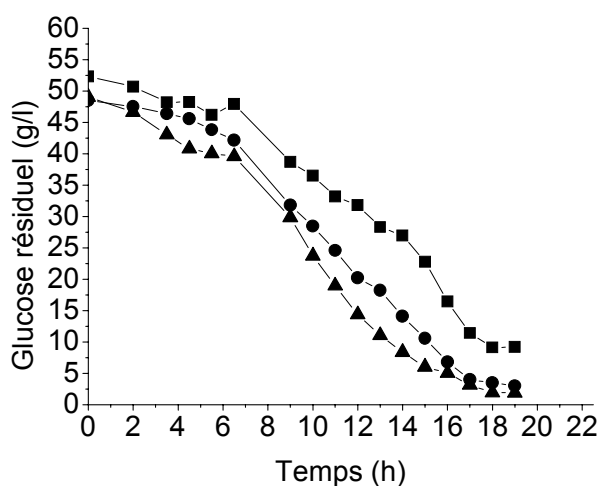


Fig. 2. Utilisation du glucose à partir du jus de datte en culture pure de *Lactobacillus casei* (■), de *Lactococcus lactis* (●) et en culture mixte (▲)

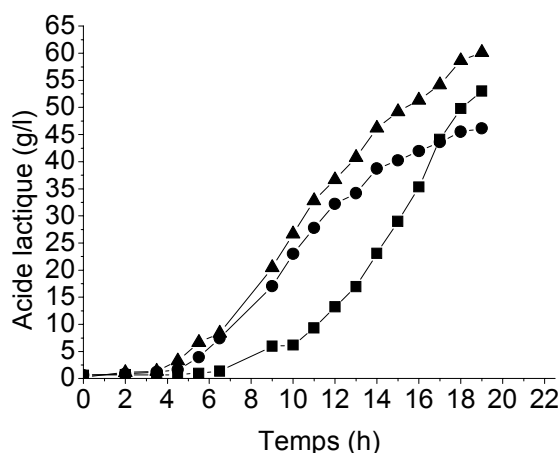


Fig. 3. Production d'acide lactique à partir de jus de datte en culture pure de *Lactobacillus casei* (■), de *Lactococcus lactis* (●) et en culture mixte (▲)

## CONCLUSION

Les résultats ont montré deux aspects importants. D'une part, Le système de culture mixte donne de meilleurs résultats concernant la production d'acide lactique et l'utilisation des sucres comparés à ceux obtenus en cultures pures de *Lactobacillus casei* ou *Lactococcus lactis*. D'autre part, le jus de datte constitue une matière première attractive pour la production d'acide lactique en culture pure et mixte de *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*.

**REMERCIEMENTS :** Ce travail est financé par un accord programme CMEP-France (Comité Mixte d'Evaluation et de Prospective) et DRU-Algérie (Direction de la Recherche Universitaire).

## REFERENCES

1. Abou-Zeid, A.A., Baeshin, N.A. & Baghlaf, A.O. (1991). The formation of oxytetracycline in date-coat medium, *Bioresource Technology*, **37**, 179-184.
2. Atkinson, B. & Mavituna, F. (1991) Industrial Microbial Processes. In : Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook (Atkinson, B. and Mavituna, F., Eds.), Macmillan Publishers Ltd, New York, 1181-1183.
3. Göksunger, Y. & Güvenç, U. (1997). Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **69**, 399-404.
4. Kurosawa, H., Ishikawa, H. & Tanaka, A.L. (1988). Lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*, *Biotechnology Bioengineering*, **31**, 183-187.

5. Özen, S. & Özilgen, M. (1992). Effects of substrate concentration on growth and lactic acid production by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *J. Chem. Tech. Biotechnol*, **54**, 57-61.
6. 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 and Microbial Technology*, **24**, 191-199.
7. Roukas, T. & Kotzekidou, P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture, *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 199-204.
8. Roukas, T. & Kotzekidou, P. (1991). Production of lactic acid from deproteinized whey by coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells, *Enzyme and Microbial. Technology*, **13**, 33-38.
9. Vikroy, T.B. (1985). Lactic acid. In : The Practice of Biotechnology : Commodity Products (Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, D.I.C., Eds.) Pergamon Press, Elmsford, NY, 761-776.