

Thèse de doctorat présentée par

Sébastien GIVRY

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Spécialité : Microbiologie Industrielle

Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de
son de blé

et

Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de
Lactobacillus bifementans.

Soutenu le devant le jury composé de :

Président	Mr Debeire P., Directeur de recherche - INRA, Reims
Rapporteur	Mr Boudrant J., Directeur de recherche - CNRS, Nancy Mme Bouix M., Professeur - ENSIA, Massy
Examineur	Mr Bliard C., Chargé de recherche - CNRS Reims Mr Bresin A., Recherche et Développement - A.R.D., Reims
Directeur de thèse	Mr Duchiron F., Professeur - Université de Reims Champagne-Ardenne

Remerciements

*Je dédie cette thèse à ma Mère :
« J'aurais tant aimé que tu sois là pour voir ce que tu as réussi,
Malheureusement tu en as décidé autrement,... »*

Dans cet avant-propos, je voudrais montrer toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, qui m'ont côtoyé et supporté durant ces années de recherche, qui m'ont soutenu et encouragé.

Je tiens à remercier en tout premier lieu Francis Duchiton qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mes stages de D.F.A. et de Maîtrise. Tout au long de ces quatre années, il a su orienter mes recherches aux bons moments en me faisant découvrir la Microbiologie Industrielle. Je salue aussi la souplesse et l'ouverture d'esprit de mon directeur de thèse qui a su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche.

Je remercie tous particulièrement Madame Marielle Bouix, Professeur à l'FNSIA de Massy, du Laboratoire de Microbiologie Industrielle, ainsi que Monsieur Joseph Boudrant, Directeur de Recherche au CNRS, du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, Institut National Polytechnique de Lorraine-FNSIA de Nancy, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

Je remercie Monsieur Philippe Debeire, qui a notablement contribué à l'obtention de cette bourse de thèse.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur Christophe Bliard pour ses précieux conseils en chimie ou en chromatographie et pour son aide dans la correction des publications.

Je remercie également Monsieur Anthony Bresin qui m'a fourni les substrats nécessaires à l'étude de cette thèse.

Parmi tous les membres du laboratoire que j'ai pu rencontrer, beaucoup sont partis, d'autres restent encore. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance, pour leur aide, les discussions, et les critiques qui m'ont permis de prendre du recul sur mon travail de thèse. À tous, aux stagiaires, aux permanents, je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir contribué à votre manière à ce travail.

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse de doctorat à ma famille et aux quelques amis que j'ai eus la chance d'avoir à mes côtés, qui m'ont soutenu tout au long de ces années de travail.

Table des Matières

Liste des abréviations	vii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xiv
Liste des communications	xvii
Résumé	xviii
Abstract	xix
Introduction	1
Chapitre 1 - Synthèse des connaissances	4
A. Les matières premières pour l'industrie chimique	4
A.1. La bioraffinerie	4
A.2. Intérêts	6
A.2.1. L'environnement	6
A.2.2. L'appauvrissement des réserves de combustibles fossiles	7
A.2.3. Le coût du pétrole.....	8
A.3. L'acide lactique	9
A.3.1. Les procédés de fabrication de l'acide lactique	10
A.3.2. Les différentes utilisations de l'acide lactique	12
A.3.3. L'acide polylactique (PLA).....	14
B. Les fermentations lactiques	17
B.1. Les bactéries lactiques : Généralités	17
B.2. Le genre <i>Lactobacillus</i>	20
B.2.1. Généralités	20
B.2.2. Importance pour l'industrie alimentaire	22
B.2.3. Importance pour le consommateur	23
B.3. Les différentes voies fermentaires	23
B.4. Transport du xylose et de l'arabinose	26
B.5. Les différents types de fermentation	27
B.5.1. La fermentation en milieu liquide	27
B.5.2. La fermentation en milieu solide	28
B.5.3. L'immobilisation	29
B.6. Construction de souches productrices d'acide lactique	30
B.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Kluyveromyces lactis</i>	31
B.6.2. <i>Rhizopus orizae</i>	33
B.6.3. <i>Escherichia coli</i> recombiné	34

B.6.4.	<i>Lactobacillus</i> recombiné	35
B.6.5.	Les systèmes vectoriels	36
B.7.	Purification de l'acide lactique	37
C.	Le blé	39
C.1.	Le grain de blé	39
C.2.	Le son de blé	40
C.2.1.	L'amidon.....	42
C.2.2.	La cellulose	42
C.2.3.	La lignine	43
C.2.4.	Les hémicelluloses	43
C.3.	Les coproduits du blé	45
C.4.	Hydrolyse des résidus hémicellulosiques	47
C.4.1.	Hydrolyse chimique et physique	48
C.4.2.	Hydrolyse enzymatique	51
C.4.3.	Procédé réalisé chez A.R.D.	52
D.	Les isomérases	55
D.1.	Présentation et Définition des isomérases	55
D.1.1.	La D-xylose isomérase	55
D.1.2.	La L-arabinose isomérase	56
D.2.	Principaux micro-organismes producteurs ou répartition	56
D.3.	Différence entre la voie d'utilisation des pentoses procaryote et eucaryote	58
D.4.	Purification	59
D.5.	Propriétés	61
D.6.	Régulation de l'expression des isomérases	63
D.6.1.	La xylose isomérase	63
D.6.2.	L'arabinose isomérase	64
D.7.	Immobilisation des isomérases	64
D.8.	Applications industrielles des isomérases	67
E.	But des études	69
Chapitre 2 - Matériel et Méthodes		70
A.	Les souches bactériennes lactiques hétérofermentaires	70
B.	Conditions de cultures des microorganismes	71
B.1.	Pré-culture	71
B.2.	Milieux de culture et inoculums	71
B.3.	Culture en fermenteur	72
B.3.1.	Production de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase	72
B.3.2.	Suivis de fermentation lactique	72
B.4.	Suivi de la croissance	72
B.4.1.	Dénombrement à la cellule de Thoma	72
B.4.2.	Estimation de la biomasse au spectrophotomètre	73
C.	Préparation du matériel biologique	74
C.1.	Isolement du contenu intracellulaire : à partir de culture en petit volume.....	74
C.2.	Isolement du contenu intracellulaire : à partir de culture en fermenteur	74

D.	Les différents substrats utilisés	75
D.1.	Les glucides	75
D.2.	Le sirop de son de blé	75
E.	Les plans d'expériences	76
E.1.	Plans factoriels complets à deux niveaux 2^k	76
E.2.	Plans de Plackett et Burman	78
E.3.	Plans d'optimisation et de modélisation	78
E.4.	Conditions de culture	79
F.	Méthode analytique	81
F.1.	Dosage des protéines intracellulaires	81
F.2.	Dosage du fructose, du ribulose et du xylulose	81
F.3.	Dosage des sucres réducteurs	82
F.4.	Dosage enzymatique	83
F.4.1.	Dosage de l'acide lactique	83
F.4.2.	Dosage de l'acide acétique	84
F.4.3.	Dosage du glucose et du fructose	84
F.5.	Chromatographie liquide haute performance : C.L.H.P.	86
G.	Techniques d'électrophorèses	87
G.1.	Electrophorèses en condition native	87
G.2.	Electrophorèses en conditions dénaturantes	87
G.3.	Electrophorèses en conditions dénaturantes douces, ou « partiellement dénaturantes »	88
G.4.	Techniques de colorations des protéines	88
G.5.	Électroéluion des protéines d'un gel de polyacrylamide	88
H.	Les activités arabinose isomérase et xylose isomérase	89
H.1.	Mesure de l'activité	89
H.2.	Paramètres physico-chimiques	89
H.2.1.	Variation du pH en fonction de la température	89
H.2.2.	Détermination de la température et du pH optimum	90
H.2.3.	Etude des paramètres cinétiques	90
H.3.	Purification de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase	92
H.3.1.	Le matériel	92
H.3.2.	Concentration des protéines	92
H.3.3.	Techniques de séparation des protéines	92
H.4.	Immobilisation de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase	93
Chapitre 3 - Résultats et Discussion : Fermentation lactique		95
A.	Introduction et hypothèse de travail	95
B.	Criblage des bactéries lactiques hétérofermentaires pour la production d'acide lactique à partir des pentoses	97

C.	Culture de <i>Lactobacillus bifementans</i> sur sucres simples	98
C.1.	Culture sur sucres simples	98
C.2.	Effet de différents ions	99
D.	Optimisation de la culture de <i>Lactobacillus bifementans</i> sur sirop de son de blé afin de produire de l'acide lactique	101
D.1.	Etude de l'impact des composants du milieu MRS	101
D.1.1.	Effet des différents composants du milieu MRS	101
D.1.2.	Optimisation et formulation du milieu de croissance du fermenteur	103
D.2.	Effet des différents paramètres de culture	110
D.2.1.	Température et pH	110
D.2.2.	L'agitation, la taille et l'âge de l'inoculum	112
D.3.	Fermentations sur milieu modifié et conclusion	114
E.	Immobilisation de <i>Lactobacillus bifementans</i> sur alginate de sodium	117
E.1.	Etude des différents paramètres d'inclusion	117
E.1.1.	Effet des ions sur l'immobilisation	117
E.1.2.	Le pourcentage d'alginate de sodium	118
E.1.3.	La biomasse immobilisée	119
E.1.4.	La taille des billes d'alginate de sodium	121
E.2.	Etude des différents paramètres de culture	122
E.2.1.	Température et pH	122
E.2.2.	Effet des ions, de la concentration en sirop de son et du rapport volume milieu/quantité de billes	124
E.3.	Etude de l'impact des composants du milieu MRS	125
E.4.	Comparaison de fermentations entre milieu MRS de base/MRS modifié et Conclusion	129
Chapitre 4 - Résultats et Discussion : Détection des cétones		131
A.	Introduction et hypothèse de travail	131
B.	Dosage du ribulose et du tagatose	134
B.1.	Détermination de la longueur d'onde	134
B.2.	Effet des différentes solutions sur la détection	134
B.2.1.	$\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$	135
B.2.2.	HCl	136
B.2.3.	Ethanol	137
B.2.4.	Orcinol	138
B.3.	Interférences sur le dosage	139
B.3.1.	Arabinose et galactose	139
B.3.2.	pH	140
B.3.3.	Dépendance de l'absorbance maximum	140
B.3.4.	Substances utilisées au cours des étapes de purification des enzymes	141
B.4.	Conclusion	142

C.	Détermination de l'activité arabinose isomérase sur gel de polyacrylamide	143
C.1.	Détection de l'activité par découpage du gel	143
C.2.	Détection de l'activité par la coloration au TTC	145
C.2.1.	Effet des concentrations en NaOH ou en TTC sur la détection des cétooses sur le gel de PAA	145
C.2.2.	Effet de la durée de l'incubation	146
C.2.3.	Effet de la concentration en enzyme	147
C.2.4.	Effet de la concentration du substrat (L-arabinose)	148
C.2.5.	Effet du tampon sur la solution test	149
C.2.6.	Effet des ions utilisés avec l'arabinose	149
C.3.	Conclusion	150
D.	Séparation et détermination par C.L.H.P.	152
D.1.	Détermination des temps de rétention à partir de différentes colonnes	152
D.2.	Influence de la phase mobile sur la détection des pics et les temps de rétention	153
D.3.	Détermination de la longueur d'onde pour la détection des cétooses	154
D.4.	Influence de la température sur le temps de rétention et la surface des pics	154
D.5.	Validation de la méthode	155
D.5.1.	Linéarités	155
D.5.2.	Précisions	156
D.5.3.	Interférences	157
D.6.	Détermination des cétooses dans le sirop de son de blé	157
D.7.	Conclusion	158
Chapitre 5 - Résultats et Discussion : Isomérases		159
A.	Introduction et hypothèse de travail	159
B.	Purification et caractérisation des activités isomérases	160
B.1.	Criblage de <i>Lactobacillus</i> et mise en évidence des activités isomérases	160
B.2.	Purification des activités isomérases	160
B.2.1.	Protocole	160
B.2.2.	Xylose isomérase	161
B.2.3.	Arabinose isomérase	164
B.2.4.	Résumé des purifications	166
B.3.	Caractérisation des enzymes	166
B.3.1.	Estimation de la masse moléculaire de l'enzyme	166
B.3.2.	Séquençage par MALDI-MS de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase de <i>Lactobacillus bif fermentans</i>	167
B.3.3.	Etude des paramètres physico-chimiques et cinétiques de l'enzyme partiellement purifiée	168
B.4.	Conclusion	174
C.	Optimisation des activités isomérases	175
C.1.	Effet de la température sur la production des enzymes	175
C.2.	Effet du pH sur la formation d'enzymes	176

C.3.	Effet d'âge et de taille d'inoculum	176
C.4.	Effet de source d'azote	177
C.5.	Effet des ions divalents	178
C.6.	Effet de source de carbone	179
C.7.	Effet des autres composants du milieu MRS	181
C.8.	Profil de croissance et de production d'enzymes	182
C.9.	Conclusion	183
D.	Immobilisation des activités isomérases sur alginate de sodium	184
D.1.	Etude des différents paramètres d'inclusion des activités isomérases	184
D.1.1.	Essai d'inclusion avec différentes molarités pour l'ion cobalt	184
D.1.2.	Effet du tampon de suspension de la biomasse cellulaire	185
D.2.	Caractérisation des propriétés de l'enzyme immobilisée	186
D.3.	Conclusion	186
 Chapitre 6 - Conclusions générales et Perspectives		188
 Références bibliographiques		192
 Annexes		215

Abréviations

A	: Absorbance
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADH	: Alcool déshydrogénase
ADP	: Adénosine 3',5'-diphosphate
AI	: Arabinose isomérase
AMP	: Adénosine 5'-monophosphate
A.R.D.	: Agro-industrie Recherches et Développements
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine 5'-triphosphate
°C	: Degré Celsius
CCC	: Central Composite Circumscribed
CCF	: Central Composite Face
CCM	: Chromatographie sur couche mince
CLHP	: Chromatographie liquide à haute pression
CPG	: Chromatographie en phase gazeuse
C/mL	: Cellule par mL
Da	: Dalton
DEAE	: Diéthyl-amnio-éthyl
DNS	: Acide 3,5-Dinitrosalicylique
DSMZ	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	: Dithiothréitol
E	: Enzyme
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
EGTA	: Acide éthylène guanidine tétraacétique
ETBE	: Ethyl-Tertiaire-Butyl-Ether
g	: Accélération
g/L	: Gramme par litre
Gb	: Giga barils
GES	: Gaz à effet de serre
GI	: Glucose isomérase
GPT	: glutamate-pyruvate transaminase
h	: Heure
HFCS	: High Fructose Corn Syrup
K_M	: Constante de Michaelis
LDH	: Lactate déshydrogénase

M	: Molaire
mL	: Millilitre
MRS	: Milieu nutritif mis au point par De Man, Rogosa et Sharpe
MS	: Matière Sèche
μ	: Micro
MES	: Acide 2-[N-morpholino] éthanesulfonique
MM	: Masse molaire
min	: Minute
MOPS	: Acide morpholino-propane-sulfonique
N	: Normalité
NAD ⁺	: Nicotinamide adénosine (forme oxydée)
NADH, H ⁺	: Nicotinamide adénosine (forme réduite)
NADP ⁺	: Nicotinamide adénosine diphosphate (forme oxydée)
NAPDH, H ⁺	: Nicotinamide adénosine diphosphate (forme réduite)
nm	: Nanomètre
p	: Poids
PAA	: Polyacrylamide
PAGE	: Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide
PDC	: Pyruvate décarboxylase
PIPES	: Piperazine-1,4-bis(2- acide ethanesulfonique)
ppm	: Partie par million
P	: Phosphate
rpm	: Rotation par minute
s	: Seconde
S	: Substrat
SFF	: Saccharification et Fermentation Simultanée
SDS	: Sodium dodécyl sulphate
SR	: Sucres réducteurs
T°C	: Température en degré Celsius
TEMED	: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TRIS	: Tris-(hydroxyméthyl)-ammoniométhane
TTC	: 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
U	: Unité enzymatique
UV	: Ultra violet
v	: Volume
V	: Vitesse de catalyse enzymatique
V_{max}	: Vitesse de catalyse enzymatique maximale
v/v	: Volume par Volume
XR	: Xylose réductase
XK	: Xylulokinase
XI	: Xylose isomérase
XDH	: Xylitol déshydrogénase

Liste des Figures

Figures présentées dans la partie *Synthèse des Connaissances*

Figure 1	: Représentation des produits de la biotechnologie blanche	5
Figure 2	: Principaux gaz à effet de serre rejetés par l'activité humaine	7
Figure 3	: Réserves prouvées et ressources de pétrole	8
Figure 4	: Évolution du prix du baril de pétrole en dollars	9
Figure 5	: Formes optiques de l'acide lactique	10
Figure 6	: Synthèse chimique de l'acide lactique	11
Figure 7	: Production par fermentation de l'acide lactique	12
Figure 8	: Les différentes applications de l'acide lactique	13
Figure 9	: Fabrication du polymère d'acides lactiques	16
Figure 10	: Arbre phylogénétique des bactéries lactiques	22
Figure 11	: Différentes voies fermentaires retrouvées chez les bactéries lactiques	25
Figure 12	: Procédé de saccharification et fermentation simultanée à partir d'amidon et de cellulose	28
Figure 13	: Méthode pour l'expression du gène <i>LDH</i>	32
Figure 14	: Voie de synthèse des acides organiques chez <i>Rhizopus orizae</i>	34
Figure 15	: Réaction de purification de l'acide lactique par la méthode d'estérification et d'hydrolyse	38
Figure 16	: Coupe longitudinale d'un grain de blé	40
Figure 17	: Structure schématique des hémicelluloses du blé	45
Figure 18	: Carte des surfaces en céréales et en blé tendre en France	46
Figure 19	: Le blé parmi les céréales en France de 1999 à 2001	46
Figure 20	: Fractionnement du blé et applications des différents produits obtenus en France	47
Figure 21	: Transformation du xylose en furfural au cours du procédé d'hydrolyse acide à chaud de polymère d'arabinoxylanes	50
Figure 22	: Présentation des différentes hémicellulases	52
Figure 23	: Procédé d'extraction des pentoses du son de blé mis en œuvre chez A.R.D.	53
Figure 24	: Réaction de conversion de la xylose isomérase	55

Figure 25 :	Réaction de conversion de l'arabinose isomérase	56
Figure 26 :	Voies d'utilisation du xylose et de l'arabinose chez les eucaryotes et les Procaryotes	59
Figure 27 :	Organisation de l'opéron xylose dans diverses bactéries	64
Figure 28 :	Différentes méthodes d'immobilisation	66

Figures présentées dans la partie *Matériel et Méthodes*

Figure 1 :	Représentation géométrique d'un domaine expérimental de 2 facteurs à 2 niveaux	77
Figure 2 :	Représentation du domaine expérimental d'un plan CCF	78
Figure 3 :	Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS	82
Figure 4 :	Principe du dosage du glucose/fructose selon le kit commercial de R-Biopharm	85

Figures présentées dans la partie *Résultats et Discussion*

Fermentation Lactique

Figure 1 :	Culture de <i>L. bifementans</i> en fonction du substrat	98
Figure 2 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du citrate de sodium et du sulfate d'ammonium	104
Figure 3 :	Comparaison des cinétiques de fermentation entre le milieu de base MRS et le milieu optimisé pour <i>L. bifementans</i>	105
Figure 4 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du Tween 80 et du phosphate d'ammonium	106
Figure 5 :	Comparaison des cinétiques de fermentation entre différents milieux MRS pour <i>L. bifementans</i>	107
Figure 6 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de l'extrait de viande, l'extrait de levure et le phosphate d'ammonium	109
Figure 7 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du pH et de la température	111
Figure 8 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de l'agitation et de la taille de l'inoculum	113
Figure 9 :	Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de la taille de l'inoculum et de son âge	114
Figure 10 :	Cinétiques de fermentation sur milieu MRS optimisé et sirop de son	115

Figure 11 :	Effet des ions et de leur molarité utilisés pour l'inclusion sur la consommation en arabinose et la production d'acide lactique par <i>L. bif fermentans</i>	118
Figure 12 :	Effet de la concentration en alginate de sodium sur la consommation en arabinose et la production d'acide lactique par <i>L. bif fermentans</i>	119
Figure 13 :	Effet de la quantité de biomasse immobilisée sur la consommation en arabinose et la production d'acide lactique par <i>L. bif fermentans</i>	120
Figure 14 :	Effet de la taille des billes sur la consommation en arabinose et la production d'acide lactique par <i>L. bif fermentans</i>	121
Figure 15 :	Réponse en 3D de l'effet du pH et de la température sur la production d'acide lactique par <i>L. bif fermentans</i> immobilisée	123
Figure 16 :	Réponse en 3D de l'effet de la concentration en ions manganèse et calcium sur la production d'acide lactique	125
Figure 17 :	Surfaces de réponses de la production d'acide lactique pour la modélisation du milieu MRS pour la souche immobilisée <i>L. bif fermentans</i>	128
Figure 18 :	Comparaison des cinétiques de fermentation entre milieux MRS de base et modifié	129

Détection des Cétoses

Figure 1 :	Représentations des principales formes -uloses	133
Figure 2 :	Spectre d'absorbance en fonction de différentes molarités de ribulose et de tagatose	134
Figure 3 :	Spectre d'absorbance en fonction de différentes quantités d'ammonium sulfate ferrique	135
Figure 4 :	Spectre d'absorbance en fonction de différentes molarités d'acide chlorhydrique	136
Figure 5 :	Spectre d'absorbance en fonction de différents pourcentages d'éthanol	137
Figure 6 :	Spectre d'absorbance en fonction de différentes quantités de résorcinol	138
Figure 7 :	Absorbance en fonction du temps de l'arabinose et du galactose à partir de différentes concentrations	139
Figure 8 :	Effet de différents tampons et pH sur le dosage	140
Figure 9 :	Gamme étalon du tagatose et du ribulose	140
Figure 10 :	Profil de détection de l'activité AI par le test au résorcinol	143
Figure 11 :	Profil de détection de l'activité AI par le test au résorcinol	144
Figure 12 :	Détection de l'activité selon le pourcentage d'acrylamide dans le gel d'électrophorèse par le test au résorcinol	145
Figure 13 :	Effet des différentes solutions de la coloration sur la détection des cétoses	146
Figure 14 :	Détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i> à différents temps de coloration sur gel de PAA	147

Figure 15 :	Détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i> à différentes concentrations sur gel de PAA	147
Figure 16 :	Effet de la concentration en arabinose lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i> sur gel de PAA	148
Figure 17 :	Effet de tampon utilisé lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i> sur gel de PAA	149
Figure 18 :	Effet de différents ions utilisé lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i> sur gel de PAA	150
Figure 19 :	Détection du ribulose et du xylulose sur colonne Aminex HPX-87H	153
Figure 20 :	Détermination de la surface des pics pour les pentoses et les cétooses correspondants selon différentes longueurs d'onde	154
Figure 21 :	Influence de la température sur l'aire des pics et le temps de rétention des cétooses	155
Figure 22 :	Gamme étalon du ribulose et du xylulose par détection UV	156
Figure 23 :	Influence de la concentration en aldose dans le milieu sur la surface des pics des cétooses correspondants par détection UV	157
Figure 24 :	Profil de séparation des glucides du sirop de son de blé et du ribulose et xylulose	158

Les Isomérases

Figure 1 :	Protocole d'obtention d'un extrait brut cytoplasmique à partir d'une culture en gros volume	161
Figure 2 :	Purification de l'activité xylose isomérase de <i>L. bif fermentans</i>	163
Figure 3 :	Purification de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i>	165
Figure 4 :	Analyse électrophorétique des enzymes AI et XI de <i>L. bif fermentans</i> , après l'étape de tamisage moléculaire	167
Figure 5 :	Influence du pH et de la température sur l'activité AI et XI purifiée de <i>L. bif fermentans</i>	168
Figure 6 :	Stabilité de l'enzyme AI de <i>L. bif fermentans</i> en fonction du pH	169
Figure 7 :	Thermostabilité de l'activité arabinose isomérase de <i>L. bif fermentans</i>	170
Figure 8 :	Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme AI purifiée de <i>L. bif fermentans</i>	173
Figure 9 :	Effet de la température sur la croissance bactérienne de <i>L. bif fermentans</i> et sur sa production en AI et XI	175
Figure 10 :	Effet du pH sur la croissance bactérienne de <i>L. bif fermentans</i> et sur sa production en AI et XI	176
Figure 11 :	Comparaison des cinétiques de production de AI et XI par <i>L. bif fermentans</i> sur MRS de base et modifié en culture batch	182

Figure 12 : Effet de la molarité de l'ion cobalt sur l'inclusion et la formation du ribulose à partir de AI de *L. bif fermentans* 185

Figure 13 : Effet du tampon de suspension de la biomasse cellulaire sur l'activité de AI de *L. bif fermentans* 185

Figure 14 : Comparaison de l'effet de la température et du pH entre AI native et immobilisée de *L. bif fermentans* 186

Liste des Tableaux

Tableaux présentés dans la partie *Synthèse des Connaissances*

Tableau 1	: Production et prix des principaux métabolites produits par fermentation	6
Tableau 2	: Exigences pour la production d'acide lactique pour les microorganismes	17
Tableau 3	: Caractérisation des bactéries lactiques	19
Tableau 4	: Classification des groupes des <i>Lactobacillus</i>	24
Tableau 5	: Système de transports du xylose	26
Tableau 6	: Avantages et inconvénients de la FMS par rapport à la FML	29
Tableau 7	: Construction de différentes souches pour améliorer la production d'acide lactique	30
Tableau 8	: Développement de systèmes vectoriels pour la construction de souches	36
Tableau 9	: La famille des <i>Gramineae</i>	39
Tableau 10	: Composition chimique des fractions de la paille de blé	41
Tableau 11	: Composition chimique du son de blé	41
Tableau 12	: Méthode de pré-traitement de la biomasse lignocellulosique	48
Tableau 13	: Distribution de quelques xylose isomérases chez les bactéries, les levures et les champignons	57
Tableau 14	: Distribution de quelques arabinose isomérases chez les bactéries	58
Tableau 15	: Exemples de quelques purifications de D-xylose isomérase bactériennes	60
Tableau 16	: Quelques propriétés de D-xylose isomérase bactériennes	61
Tableau 17	: Quelques propriétés de L-arabinose isomérase bactériennes	62
Tableau 18	: Avantages et inconvénients des enzymes industrielles	67

Tableaux présentés dans la partie *Matériel et Méthodes*

Tableau 1	: Composition du sirop de son de blé	75
Tableau 2	: Matrice d'expérience d'un plan factoriel complet 2^2	77
Tableau 3	: Exemple d'une matrice d'un plan CCF à 3 facteurs	79

Tableaux présentés dans la partie *Résultats et Discussion***Fermentation Lactique**

Tableau 1	: Criblage des bactéries lactiques hétérofermentaires	97
Tableau 2	: Effet de différents ions sur la culture de <i>L. bifementans</i>	100
Tableau 3	: Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS	101
Tableau 4	: Résultats de l'analyse de Plackett et Burmann pour la production d'acide lactique	102
Tableau 5	: Matrice et réponses du plan d'optimisation de la production d'acide lactique : effet du citrate de sodium et du sulfate d'ammonium	103
Tableau 6	: Matrice et réponses du plan d'optimisation de la production d'acide lactique : effet du Tween 80 et du phosphate d'ammonium	106
Tableau 7	: Matrice et réponses de l'effet de la concentration en extrait de viande, extrait de levure et phosphate d'ammonium	108
Tableau 8	: Matrice et réponses de l'effet de la température et du pH	110
Tableau 9	: Matrice et réponses de l'effet de l'inoculum, de son âge et de l'agitation	112
Tableau 10	: Comparaison des consommations et production d'acides entre les fermentations en 1 étape et 2 étapes sur milieu MRS modifié	116
Tableau 11	: Effet des ions à 50 mM sur l'inclusion par alginate de sodium	117
Tableau 12	: Effet de la phase de récupération de la biomasse et du substrat inducteur sur la consommation en arabinose ou en xylose et sur la production d'acide lactique par <i>L. bifementans</i>	120
Tableau 13	: Matrice et réponses de l'effet de la température et du pH sur la production d'acide lactique par <i>L. bifementans</i> immobilisée	122
Tableau 14	: Matrice et réponses de l'effet de la concentration des ions manganèse et calcium	124
Tableau 15	: Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS sur la production d'acide lactique par <i>L. bifementans</i> immobilisée selon le plan de Plackett et Burmann	125
Tableau 16	: Résultats de l'analyse de Plackett et Burmann pour la production d'acide lactique	126
Tableau 17	: Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS sur la production d'acide lactique par <i>L. bifementans</i> immobilisée	127
Tableau 18	: Comparaison des consommations et production d'acides entre les fermentations sur milieu MRS de base et modifié	130

Détection des Cétoses

Tableau 1	: Interférences de différentes substances sur le dosage	141
Tableau 2	: Temps de rétention des étalons sur différentes colonnes	152

Tableau 3	: Variabilité des temps de rétention	156
------------------	--	-----

Les Isomérases

Tableau 1	: Criblage des activités isomérases chez les souches du genre <i>Lactobacillus</i>	160
Tableau 2	: Essais de précipitations sur l'activité xylose isomérase	162
Tableau 3	: Essais de précipitations sur l'activité arabinose isomérase	164
Tableau 4	: Schéma de purification des activités AI et XI	166
Tableau 5	: Effet de divers composés chimiques sur les activités AI et XI de <i>L. bifementans</i>	171
Tableau 6	: Effet de divers ions sur les activités AI et XI de <i>L. bifementans</i>	172
Tableau 7	: Effet des différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne de <i>L. bifementans</i> et la production des enzymes AI et XI	177
Tableau 8	: Effet de différents ions bivalents sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour <i>L. bifementans</i>	178
Tableau 9	: Effet de la source de carbone et de sa concentration sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour <i>L. bifementans</i>	180
Tableau 10	: Effet des différents composants du milieu MRS sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour <i>L. bifementans</i>	181

Liste des Communications

Communications Affichées

Givry S., Duchiron F. Étude de la biosynthèse des endopolysaccharides de réserve chez l'archéon hyperthermophile *Thermococcus hydrothermalis*. Colloque micro-organisme et environnement 2002 - Rennes (France): 16 - 17 janvier 2002.

Gruyer, S., Givry S., Copinet, E., Duchiron F. Current knowledge about biosynthesis of glycogen in *Thermococcus hydrothermalis*. Thermophiles 2003 - Exeter (Grande-Bretagne): 15-19 septembre 2003.

Givry S., Duchiron F. Fermentation performance by various *Candida shehatae* for bioethanol production from wheat bran syrup. Renewable resource and bioenergy - Ghent (Belgique): 19-21 septembre 2005.

Givry S., Duchiron F. Fermentation of wheat bran syrup by an heterolactic acid bacteria *Lactobacillus bif fermentans*. Renewable resource and bioenergy - Ghent (Belgique): 19-21 septembre 2005.

Givry S., Prevot, V., Duchiron F. Simultaneous isomerisation and fermentation of xylose to ethanol by *Candida maltosa* with response surface methodology. Pentoses 2006 - Reims (France): 22-25 octobre 2006.

Givry S., Duchiron F. Lactic acid production from oligoxylose of wheat bran hemicellulose by *Lactobacillus bif fermentans*. Pentoses 2006 - Reims (France): 22-25 octobre 2006.

Communications Orales

Givry S., Duchiron F. Isomérisation et fermentation alcoolique des pentoses du blé. Utilisation de levures. Journées Prix Jeunes Chercheurs 2004 - Reims.

Givry S., Duchiron F. Isomérisation de sucres de biomasse végétales afin d'être assimilable par les levures pour produire du bio-éthanol. 6e forum des biotechnologies de l'ESIL 20-10-2005 sur « Enzymes et biotechnologies : quelles applications, quelles innovations ? » - Marseille.

Givry S., Duchiron F. Isomérisation des pentoses du son de blé afin d'être assimilable par des levures pour la production de bio-éthanol. Concours « Les Millésimés Europol'Agro » 2005 organisé par la Fondation du Site Paris-Reims et Europol'Agro - Reims.

Givry S., Duchiron F. Biosynthèse d'acide lactique à partir du son de blé. Séminaire interne INRA 14-11-2006 - Reims.

Givry S., Duchiron F. Séminaire interne Europol'Agro.

Publications

Givry S., Bliard, C. Duchiron F. Selective ketopentose analysis in concentrate carbohydrate syrups by HPLC. In press (2007): Carbohydrate Research.

Givry S., Duchiron F. A spectrophotometric assay for the detection and determination of the activity L-arabinose isomerase. En soumission (Avril 2006): Enzyme Microbial and Biotechnology.

Givry S., Duchiron F. Detection of L-arabinose isomerase activity on polyacrylamide gel. En soumission (Aout 2006): Journal of biochemical and biophysics methods.

Givry S., Duchiron F. Optimization of culture medium and conditions for L-arabinose isomerase and D-xylose isomerase production by the eubacterium *Lactobacillus bifermentans*. En soumission (Aout 2006):

Givry S., Prevot, V., Duchiron F. Lactic acid production from hemicellulosic hydrolyzate by cells of *Lactobacillus bifermentans* immobilized in Ca-alginate using response surface methodology. En soumission (Septembre 2006): Journal of biotechnology.

publications en cours de rédaction,

Titres provisoires :

Auteurs : **Givry S., Duchiron F.**

1. Purification and characterization arabinose isomerase of *Lactobacillus bifermentans*

Auteurs : **Givry S., Prevot, V., Duchiron F.**

2. Optimization of lactic acid production from wheat bran syrup by *Lactobacillus bifermentans* using response surface methodology.

Résumé

La production d'acide lactique à partir de ressources renouvelables telles que le son de blé comme alternative aux produits dérivés du pétrole présente un intérêt grandissant, notamment pour la production de polymère biodégradable d'acide lactique. Le son de blé est un co-produit composé d'hexoses et de pentoses et son utilisation comme substrat de faible coût dans diverses industries est envisagée. Cependant, peu de microorganismes consomment rapidement et efficacement les pentoses pour donner un seul et même produit. Dans le but de fermenter ces pentoses, un criblage a été réalisé et a permis d'isoler, une bactérie lactique *Lactobacillus bifementans* qui par la suite nous avons cherché à optimiser la production d'acide lactique de cette souche par des méthodes statistiques de surfaces de réponse, et cela, pour deux procédés de fermentation en réacteur batch : cellules libres et par inclusion des cellules sur calcium-alginate.

Dans un second temps, nous avons optimisé la production des activités xylose isomérase et arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Ces enzymes présentent en effet un intérêt commercial important au niveau industriel pour la production de sirop de fructose et de tagatose. La xylose isomérase joue également un rôle dans la production d'éthanol à partir du xylose en fermentation simultanée avec des levures. Après amélioration des conditions de culture, ces enzymes ont été produites en fermenteur, purifiées et caractérisées. Finalement, *Lactobacillus bifementans* ne possède qu'une seule enzyme, l'arabinose isomérase, qui réalise ces deux activités et qui présente des similitudes avec l'arabinose isomérase de *Lactobacillus pentosus*.

Mots clés : Production, Acide lactique, Son de blé, Pentoses, Arabinose isomérase, *Lactobacillus bifementans*

Abstract

Lactic acid production from renewable resources such as wheat straw as alternate to derived products from oil present a growing interest, in particular for the production of biodegradable polylactic acid polymer. The wheat straw is a by-product composed of hexoses and pentoses and its use as substrate of low cost in various industries is considered however, few microorganisms consume quickly and effectively pentoses to give a single product. Lactic acid bacteria were screened for pentoses fermentation and *Lactobacillus bifermentans* showed the highest levels of lactic acid production. Thereafter we have optimized lactic acid production by this strain using response surface methodology, and that, for two fermentation process in batch bioreactor: free cells and by cells inclusion in calcium alginate.

In the second time, we describe the optimization of an appropriate fermentation medium for xylose isomerase and arabinose isomerase production by *Lactobacillus bifermentans*. These enzymes have received increased attention by industries for their use in producing high fructose concentration syrup and tagatose. Xylose isomerase also presents potential application in the production of ethanol from xylose in simultaneous fermentation with yeasts. After improvement of the conditions of culture, these enzymes were produced out of bioreactor, purified and characterized. Finally, *Lactobacillus bifermentans* has only one enzyme, L-arabinose isomerase, which carried out these two activities and which presents similarities with L-arabinose isomerase of *Lactobacillus pentosus*.

Keywords: Production, Lactic acid, Wheat bran, Pentose, Arabinose isomerase, *Lactobacillus bifermentans*

Introduction

Le développement durable est « un développement qui répond aux besoins du présent sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs ». C'est dans ce contexte que les biotechnologies blanches représentent aujourd'hui un marché sérieux, profitable, intégré et international, avec pour principales motivations officielles l'environnement, la sécurité d'approvisionnement, le maintien d'une agriculture viable et la génération d'emplois.

À ce jour, le recours aux biotechnologies et aux ressources renouvelables en tant qu'alternatives à la chimie industrielle fondée sur les matières premières d'origine fossile présente de nombreux avantages par rapport aux ressources pétrolières qui présentent maintenant de nombreux inconvénients. Le premier et non le moindre est environnemental avec les problèmes liés à l'effet de serre, en effet la concentration élevée de polluants dans l'air ne cesse de s'accroître, par conséquent la mise en œuvre de technologies propres et la biodégradabilité souhaitée pour les produits industriels sont de plus en plus importantes. Le second, qui est tout aussi problématique, est l'épuisement à terme des ressources en pétrole. Pour permettre la réduction de la consommation en énergies fossiles, on peut améliorer les performances des équipements et favoriser le plus rapidement possible la pénétration des produits issus des ressources renouvelables. Le dernier problème dû aux crises ponctuelles du pétrole, est que les gouvernements souhaitent leur indépendance énergétique L'accent a donc été mis sur les économies d'énergies.

C'est pour toutes ces raisons que l'évolution des polymères biodégradables produits à partir de l'acide lactique, tournée vers l'utilisation des produits agricoles, intéresse fortement la région Champagne-Ardenne qui dispose d'un fort potentiel de production en biomasse végétale, et ce, principalement sous forme de céréales. Alors que les sucres à 6 atomes de carbone issus de céréales sont valorisés dans des applications industrielles depuis de nombreuses années, il n'en est pas de même pour les sucres à 5 atomes de carbone. Le xylose et l'arabinose, principaux constituants des hémicelluloses, composent 6-8% de la matière sèche du blé. Ces sucres sont synthétisés par la plante sous la forme d'arabinoxylanes servant de tissus de soutien. Ces

molécules carbonées, mal valorisées, se doivent de trouver des applications industrielles afin d'optimiser l'utilisation de la biomasse produite par l'agriculture et participer ainsi à l'instauration d'une filière de valorisation du brut végétal fiable assurant de ce fait un débouché viable à l'agriculture régionale.

Le blé représente actuellement une des cultures céréalières les plus importantes et la plus utilisée de la planète. Sa structure (hors grain) est principalement constituée de lignocellulose, assemblage complexe de lignine, de cellulose et d'hémicellulose. Celle-ci représente la principale forme de biomasse végétale au monde et sans doute l'une des moins coûteuses de par sa quantité. Lors des étapes industrielles de broyage du blé, de nombreux co-produits, tel que le son, sont générés. En général, ces parties sont soit brûlées, soit utilisées pour des applications de faibles valeurs ajoutées comme l'alimentation animale dans le cas du son de blé. L'utilisation de ce dernier dans d'autres procédés industriels permettrait la production de molécules à hautes valeurs ajoutées, mais aussi une économie en terme de substrat. Cependant, l'accessibilité des hexoses et des pentoses contenus dans les fractions cellulosiques et hémicellulosiques du son de blé reste difficile. De plus, il existe actuellement peu de souches capables de réaliser rapidement et efficacement la fermentation de ces glucides en un seul et même produit.

Ce travail de thèse s'inscrit dans cette volonté d'utiliser les ressources renouvelables afin de remplacer les produits dérivés issus du pétrole. Pour cela nous utiliserons les procédés de fermentation en milieu liquide et d'immobilisation de cellules afin de produire de l'acide lactique à partir d'un sirop de son de blé constitué d'hexoses et de pentoses.

Dans un second temps, cette thèse s'intéressera à deux activités de la famille des isomérases, l'arabinose isomérase et la xylose isomérase caractérisée chez la bactérie lactique *Lactobacillus bifementans*. Les isomérases sont les enzymes les plus utilisées au niveau industriel sous la forme immobilisée pour la production de sirop de fructose à partir du glucose à l'aide de la xylose isomérase et dernièrement pour la production de tagatose à partir du galactose par action de l'arabinose isomérase.

Nous commencerons dans le Chapitre I par un état des lieux des connaissances sur la raffinerie du végétale qui nous amènera plus précisément à traiter différents points concernant l'acide lactique, tels que son utilisation, les différents procédés de production et les microorganismes

capables de réaliser la fermentation lactique. Ensuite, nous développerons une partie sur l'obtention du sirop de son de blé et dans une dernière partie nous discuterons des isomérases, sans oublier leurs intérêts dans les applications industrielles. Les Matériels et Méthodes de cette thèse seront décrits dans le Chapitre II.

Dans le Chapitre III, nous nous intéresserons à la production de l'acide lactique sur sirop de son de blé à l'aide de la bactérie lactique *Lactobacillus bifermentans*. Pour cela nous décrirons l'optimisation de deux procédés soit par culture en réacteur batch avec des cellules libres soit par l'immobilisation de cette même souche par inclusion sur alginat de sodium.

Enfin dans les Chapitres IV et V nous étudierons tout d'abord différentes méthodes capables de détecter et de quantifier les isomères obtenus à partir des pentoses à l'aide des isomérases. Ces dernières seront étudiées dans la dernière partie avec tout d'abord la purification et la caractérisation de ces enzymes, puis la mise au point de l'optimisation de la production de ces activités par *Lactobacillus bifermentans*, et ce, afin de les immobiliser pour la production de cétooses, xylulose et ribulose, plus facilement utilisables par certaines souches par exemple les levures.

Pour terminer dans le chapitre VI, nous réaliserons un bilan des différentes études menées durant cette thèse et nous discuterons des perspectives amenées par ce travail.

Synthèse des connaissances

A. Les matières premières pour l'industrie chimique

A.1. La bioraffinerie

Depuis les années 90, ce concept de bioraffinerie, également appelé raffinerie du végétal ou biotechnologie blanche, prend de l'ampleur et est basé sur le modèle de la raffinerie pétrolière qui utilise le pétrole brut pour la fabrication de carburants et de produits dérivés tels que le plastique [Bienfait *et al.*, 2003 ; Flashel *et al.*, 2004]. De façon similaire la bioraffinerie consiste à fractionner la plante entière pour ensuite purifier et transformer les différentes parties alors que très longtemps la plante n'était pas du tout valorisée et générait de nombreux déchets [Figure 1]. En effet, la biomasse végétale était utilisée dans son entier ou subissait seulement des transformations élémentaires, telles que la fabrication de papier, le bois de chauffage et de construction, le textile, l'alimentaire [Lee et Jang, 2006].

Cette biotechnologie blanche utilise les systèmes biologiques pour produire des produits chimiques utiles à travers la biocatalyse (utilisation d'enzymes) et la fermentation (utilisation de micro-organismes) à partir de ressources renouvelables et de produits d'origine fossiles [Lorenz et Zinke, 2005 ; Stassin et Liénard, 2005].

Les micro-organismes sont ainsi employés pour produire une grande variété de composés. Ces composés peuvent être subdivisés en deux groupes, ceux dont la production est associée à la croissance (métabolites primaires) et ceux dont la synthèse se produit après la croissance cellulaire (les métabolites secondaires). Les métabolites primaires peuvent être encore subdivisés en vitamines et en acides aminés, qui normalement sont produits dans les quantités suffisantes pour la croissance cellulaire, et ceux tels que l'éthanol et l'acide lactique, qui sont produits en plus grande quantité parce qu'ils sont les produits métaboliques retrouvés au final. L'éthanol, l'acétone, le butanol, l'acide lactique et le glycérol sont des produits traditionnels de l'industrie de fermentation. La production fermentaire de ces produits finaux métaboliques est

employée commercialement quand les approches chimiques conventionnelles ne sont pas faisables ou trop coûteuses [Nagazawa et Yamada, 1995].

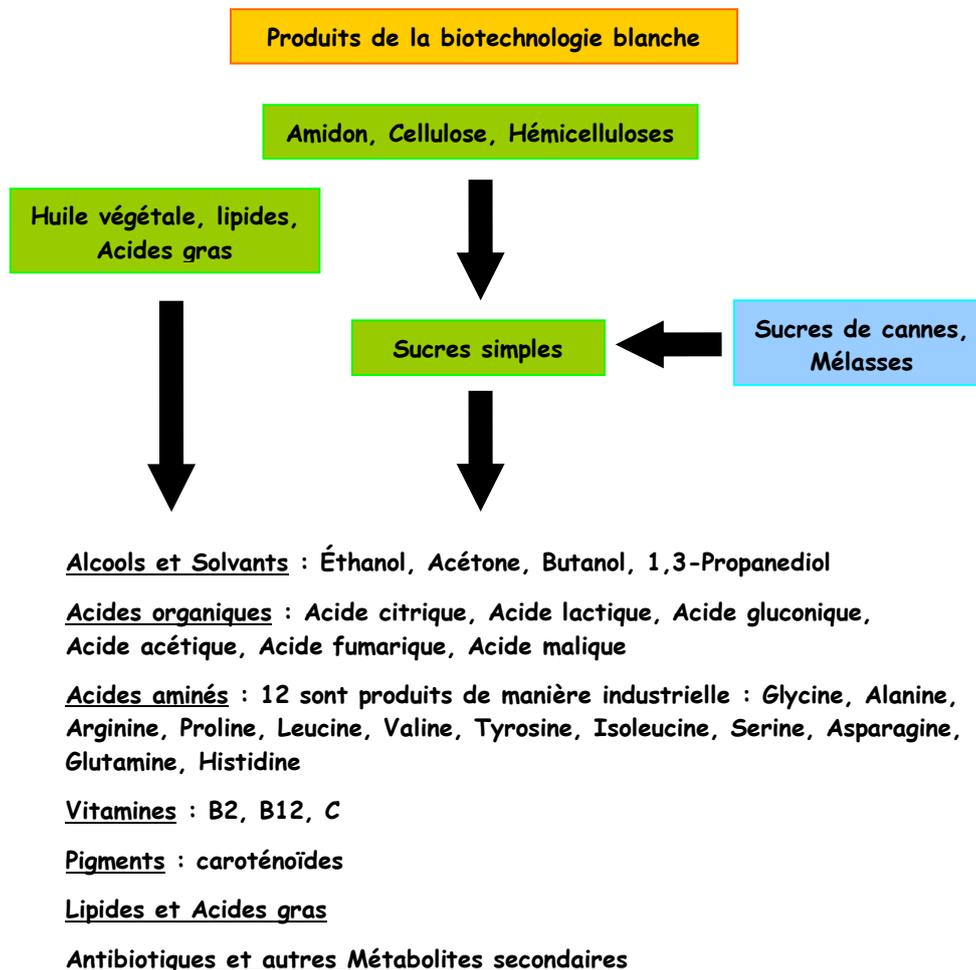


Figure 1 : Représentation des produits de la biotechnologie blanche [Lee et Jang, 2006].

La bioraffinerie permet ainsi d'obtenir différents avantages techniques par rapport à la technologie de la chimie conventionnelle [Stassin et Liénard, 2005] :

- une cinétique de réaction plus rapide ;
- un meilleur rendement de conversion ;
- une plus grande pureté du produit final ;
- une réduction de la consommation d'énergie ;
- une nette diminution de la production de déchets et résidus chimiques.

Au niveau de l'industrie chimique, le marché des métabolites primaires représente par conséquent un marché important en terme de volumes dans le cadre d'une valorisation de la biomasse [Tableau 1].

Tableau 1 : Production et prix des principaux métabolites produits par fermentation.

Produits	Production mondiale (Tonnes/an)	Prix marché mondial (Euros/kg)
Bioéthanol	26 000 000	0,4
Acide L-glutamique	1 000 000	1,5
Acide citrique	1 000 000	0,8
L-lysine	350 000	2
Acide lactique	250 000	2
Vitamine C	80 000	8
Acide gluconique	50 000	1,5
Antibiotiques (commodités)	30 000	150
Antibiotiques (spécialisés)	5 000	1 500
Xanthane	20 000	8
L-hydroxyphénylalanine	10 000	10
Vitamine B12	15	25 000

A.2. Intérêts

Ces dernières années, l'accroissement de l'intérêt pour la biotechnologie blanche (ou industrielle) est la conséquence de plusieurs raisons [Bienfait *et al.*, 2003] :

- l'environnement ;
- l'appauvrissement des réserves de combustibles fossiles ;
- le coût du pétrole ;

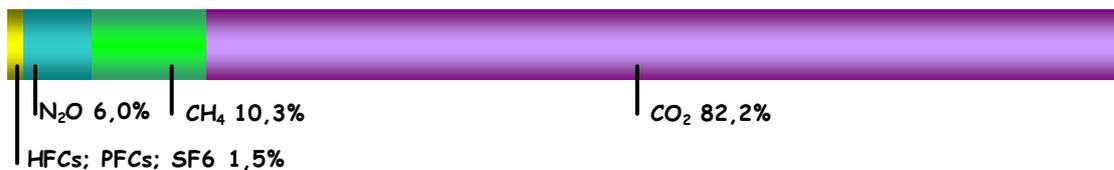
A.2.1. L'environnement

La pression de l'opinion publique pour la lutte contre l'effet de serre a poussé les pouvoirs publics à trouver des solutions pour réduire les émissions de gaz à effet de serre.

Pour se faire, un accord international a été signé entre les pays afin de réduire cet effet de serre. Il s'agit du protocole de Kyoto qui est un traité sur le changement climatique visant, en particulier, à réduire les émissions de gaz à effet de serre [Protocole de Kyoto, 1997]. Les pays industrialisés l'ayant ratifiés en 1997 se doivent de réduire leurs émissions de 6 gaz à effets de serre [Figure 2] à l'horizon de 2010 [Mission interministérielle de l'effet de serre, 2004] :

- le dioxyde de carbone (CO_2) : énergies fossiles et déforestations ;
- le méthane (CH_4) : élevages, cultures, exploitations pétrolières ;
- les oxydes nitreux (N_2O) : engrais ;
- les hydrofluorocarbones (HFCs) et les perfluorocarbones (PFCs) : gaz réfrigérants et aérosols ;
- l'hexafluorure de soufre (SF_6) : transformateurs électriques.

% différents GES (2001)



% GES par secteurs (2001)

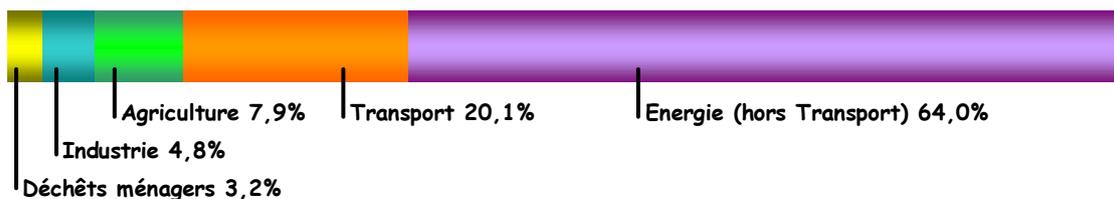


Figure 2 : Principaux gaz à effet de serre rejetés par l'activité humaine [Unfccc, 2004].

A.2.2. L'appauvrissement des réserves de combustibles fossiles

De nombreuses études sont réalisées afin d'estimer le potentiel des bassins (réserves découvertes plus réserves à découvrir). Ces méthodes sont multiples et peuvent être combinées, mais elles ne sont fiables que pour des domaines naturels (système pétrolier) dont le degré de

maturité est avancé, c'est-à-dire quand les gisements sont produits à pleine capacité, ce qui est le cas des principaux bassins pétroliers [EIA, 2003].

De plus, il y a souvent confusion entre ressources (potentiel d'hydrocarbures restant à découvrir ou accroissement des réserves résultant d'une amélioration des conditions économiques ou techniques) et réserves (quantités d'hydrocarbures identifiées que l'on sait produire dans de bonnes conditions économiques et opérationnelles).

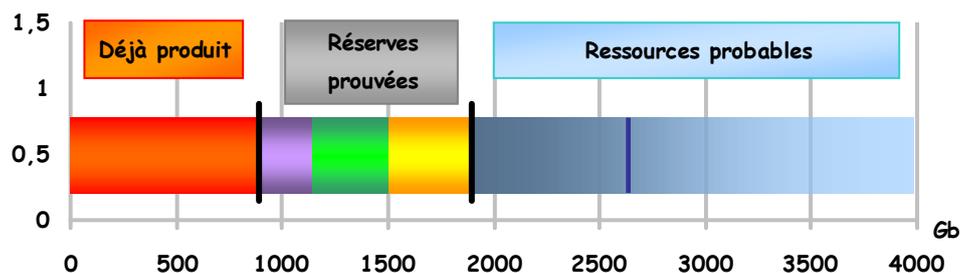


Figure 3 : Réerves prouvées et ressources de pétrole : Arabie Saoudite (■), Autres Moyen-Orient (■), Reste du Monde (■) [TOTAL, 2003].

Les réserves prouvées de pétrole sont estimées à environ 1 000 Gb dont 62% sont concentrés dans cinq pays du Moyen-Orient. Compte tenu des connaissances actuelles et des progrès techniques, les ressources conventionnelles de pétrole sont estimées à 700 Gb. On estime en outre, que les quantités non conventionnelles de pétrole potentiellement récupérables (huiles lourdes essentiellement) seraient comprises entre 500 et 1 000 Gb. Par conséquent aujourd'hui, on évalue les réserves à 40 ou 50 ans [Pasty, 2004]. Celles-ci ne seraient plus que d'environ 30 ans en tenant compte des perspectives de croissance du scénario tendanciel de l'agence internationale pour l'énergie [ADEME, 2002 et Fontaine, 2003].

A.2.3. Le coût du pétrole

Enfin, le baril de brut évolue depuis 100 ans dans une fourchette de prix entre 1 et 70 dollars et ce prix de l'or noir est important pour l'ensemble de l'économie mondiale [Figure 4]. Par exemple, la crise de l'OPEP de 1973 a eu d'énormes conséquences sur les économies des pays industrialisés en effet de 1920 à 1970, le prix des hydrocarbures est resté dans un canal qui a comme plafond la zone des 5 dollars le baril. Mais, suite à cette crise le prix du baril sort de son ancien canal et va évoluer dans une fourchette de prix comprise entre 10 et 40 dollars, pour ne

plus jamais redescendre en dessous de ce seuil. Des crises ponctuelles poussent les prix jusqu'à 40 dollars et des hausses de brèves périodes de surproduction font descendre les prix jusque dans la zone des 10-15 dollars le baril [EIA, 2004].

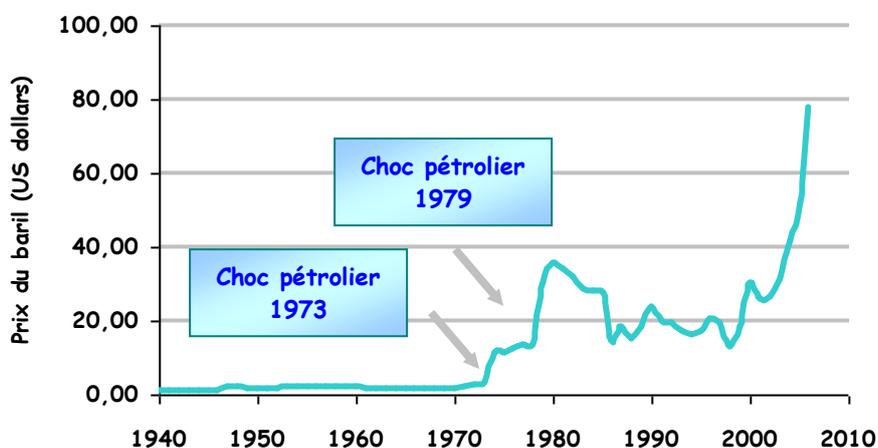


Figure 4 : Évolution du prix du baril de pétrole en dollars [EIA, 2003].

Cependant, les évolutions des cours du pétrole sur les deux dernières années sont en constante augmentation jusqu'à atteindre les 78 dollars fin juillet 2006. La hausse des prix actuelle peut être vue comme une crise ponctuelle et passagère, le pétrole retournera dans son canal en dessous de 40 dollars. Autre solution, comme dans les années 1970, un équilibre est rompu et le marché n'est plus sous contrôle, ce qui entraînera les prix du baril vers une nouvelle zone de prix beaucoup plus haute. On peut aussi penser, que sur fond de pic de production, le prix ne fera que monter jusqu'à la dernière goutte d'essence. La résistance est aujourd'hui devenue support, c'est pour cela que la zone des 40 dollars est très importante, il faut surveiller très attentivement ce secteur de prix [Perspectives économiques de l'OCDE, 2003].

Toutes ces raisons amènent les gouvernements à réaliser des efforts pour prolonger la durée de vie des réserves permettant non seulement de retarder le déclin des hydrocarbures, mais aussi de mettre à profit le temps ainsi gagné pour développer des politiques favorisant l'émergence des solutions alternatives. En parallèle, il faut apprendre à consommer moins et mieux, en affectant chacune des ressources disponibles aux usages pour lesquels elles sont les mieux adaptées [Chevrier *et al.*, 2001].

A.3. L'acide lactique

L'acide lactique (ou acide 2-hydroxy propionique) est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants allant des procaryotes anaérobies à l'homme et représente l'un des acides organiques les plus importants. Il existe sous deux formes optiques, le D- et le L-acide lactique.

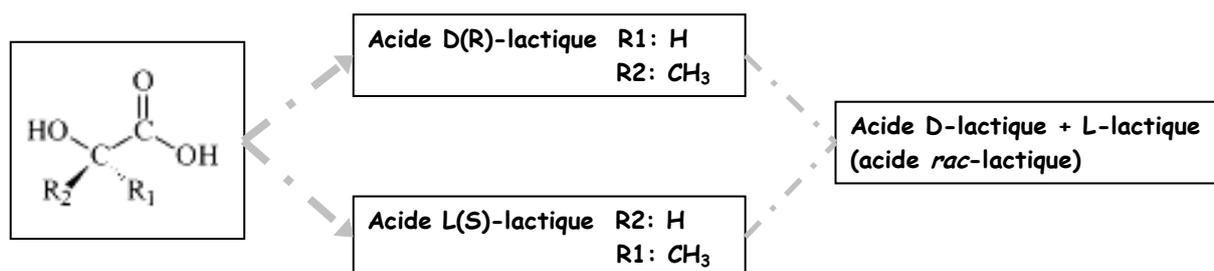


Figure 5 : Formes optiques de l'acide lactique [Södergard et Stolt, 2002]

L'acide lactique est odorant, n'est pas volatile, possède un goût acide moyen et est catalogué comme GRAS. Il possède un potentiel chimique important, c'est pourquoi il est largement utilisé en industrie. Il apparaît également comme un très bon conservateur naturel au niveau alimentaire tel que dans la choucroute, les olives, les yaourts, les fromages et divers produits cueillis.

Chaque année, environ 50 000 à 80 000 tonnes d'acide lactique sont produites à travers le monde dont 90% sont réalisées à partir de fermentation microbienne. Les 10% restants sont produits synthétiquement à partir du lactonitrile [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000]. Le prix d'un kg d'acide lactique peut aller de 1,40 US\$ pour 50% de pureté à 1,90 US\$ pour 88% de pureté [Akerberg et Zacchi, 2000].

A.3.1. Les procédés de fabrication de l'acide lactique

La production d'acide lactique se fait actuellement selon deux procédés distincts soit par synthèse chimique, soit par fermentation depuis 1881 [Oh *et al.*, 2005; Vickroy, 1985; Atkinson et Mavituna 1991].

- **La synthèse chimique**

Cette synthèse de l'acide lactique s'effectue à partir du lactonitrile [Figure 6], co-produit issu de la synthèse de l'acrylonitrile. La formation de ce précurseur est réalisée par une catalyse de base en ajoutant du cyanure d'hydrogène à de l'acétaldéhyde. Cette réaction est effectuée en phase liquide sous pression atmosphérique.

Le lactonitrile brut, issu de cette réaction, est alors récupéré et purifié par distillation. Il sera ensuite dégradé en acide lactique à l'aide d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique, produisant des quantités correspondantes de sels d'ammonium. Afin d'être purifié, l'acide lactique produit lors de cette hydrolyse est estérifié avec du méthanol, permettant ainsi la formation de lactate de méthyle qui sera à son tour récupéré et purifié par distillation, puis hydrolysé dans de l'eau en condition acide. Au final, l'acide lactique sera purifié et concentré, tandis que le méthanol sera recyclé [Datta *et al.*, 1995].

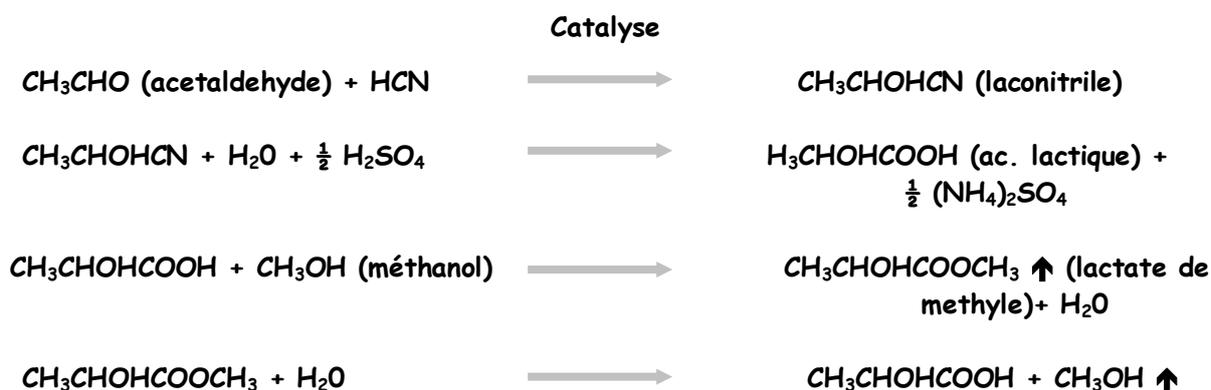


Figure 6 : Synthèse chimique de l'acide lactique [Datta *et al.*, 1995]

- **La fermentation**

Elle permet de produire le stéréo-isomère d'acide lactique désiré grâce à l'utilisation de bactéries lactiques homofermentaires.

Lors des fermentations, réalisées en mode batch pendant 4 à 6 jours, du carbonate de calcium est ajouté afin de neutraliser l'acide produit. Cet apport entraîne la formation de sels de calcium de l'acide, permettant une séparation plus facile par filtration puis par évaporation. Ces sels

seront ensuite acidifiés avec de l'acide sulfurique afin de les convertir en acide lactique et en sulfate de calcium insoluble qui sera enlevé par filtration. Une purification par des colonnes échangeuses d'ions est enfin réalisée sur ce filtrat, suivie d'une évaporation afin de produire l'acide lactique alimentaire, lequel s'avère peu stable à la chaleur.

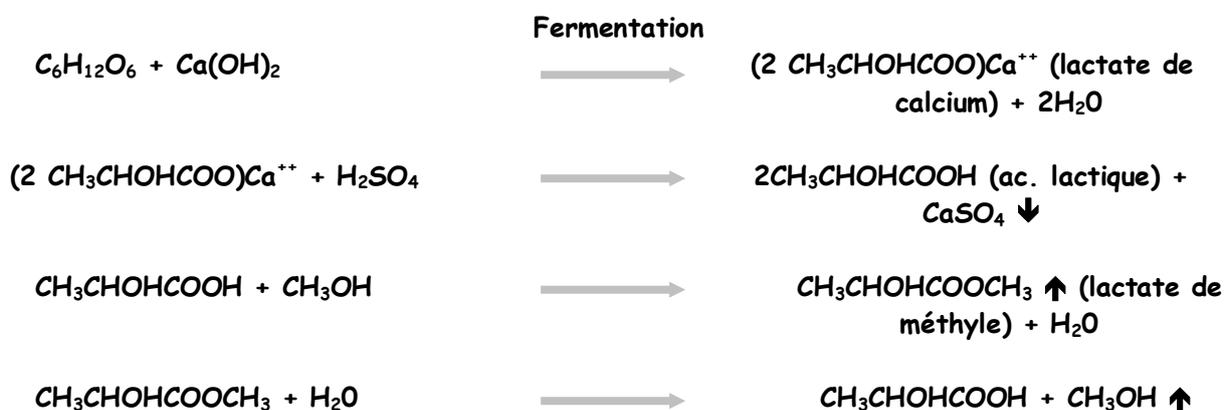


Figure 7 : Production par fermentation de l'acide lactique [Datta *et al.*, 1995]

Au final, les différences entre ces deux modes de production résident dans l'obtention d'un acide lactique pur optiquement. La synthèse chimique ne peut produire que des racémiques contrairement à la synthèse biologique qui permet d'obtenir une pureté optique, grâce au choix d'une souche ne produisant que l'acide D- ou L- lactique [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000].

Les rendements de production de l'acide lactique industriels obtenus sont en général d'environ 90-99%, avec un apport initial en sucre de 5%. Une grande variété de substrats peut-être utilisée comme le dextrose, le sucre de canne, les mélasses, le sirop de maïs. L'utilisation d'un substrat particulier dépend de son prix, de sa disponibilité et de sa pureté.

A.3.2. Les différentes utilisations de l'acide lactique

Actuellement, l'acide lactique est principalement utilisé dans l'alimentation ou dans des applications liées à l'alimentation (environ 85% de la demande aux États-Unis). Les 15% restants étant utilisés pour des applications non alimentaires telles que dans les industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques, celles du cuir, ou comme herbicide [Timbuntam *et al.*, 2006 ; Sreenath *et al.*, 2001]. Ils sont également employés lors de la production de produits chimiques

de base comme l'ester de lactate, l'acétaldéhyde, l'acide acrylique, l'acide propanoïque,... dans les industries chimiques ou pour être polymérisés en acide polylactique biodégradable [Figure 8] [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000 ; Ding et Tan, 2006].

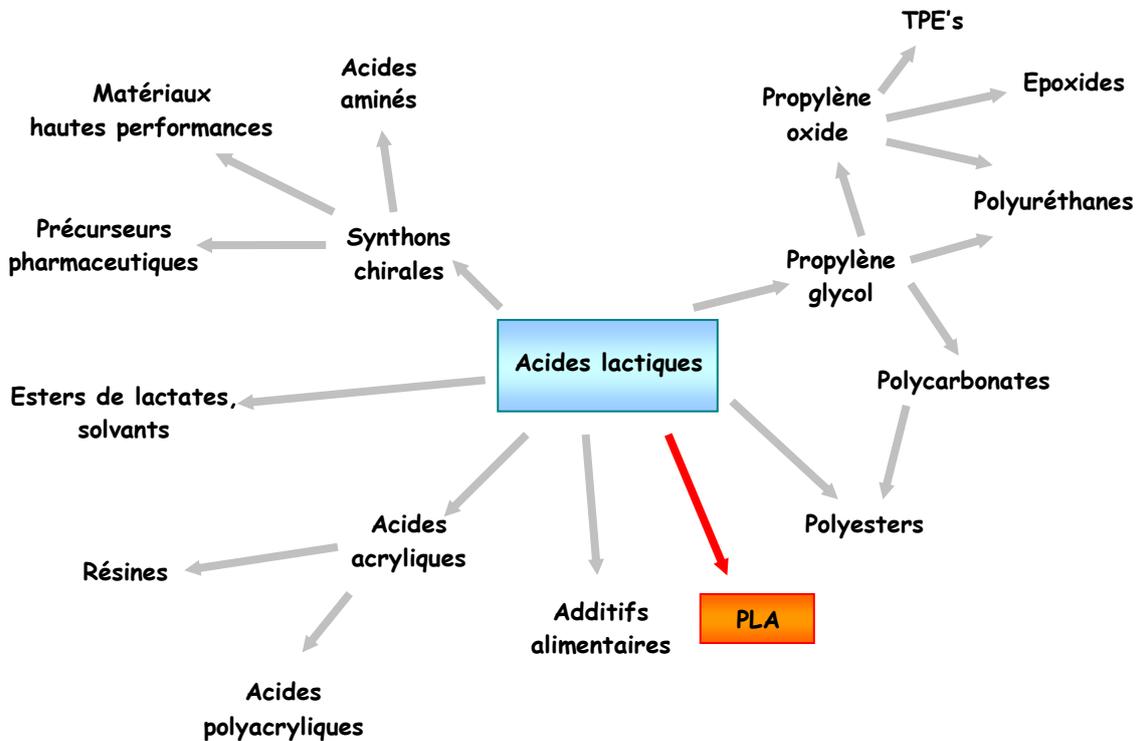


Figure 8 : Les différentes applications de l'acide lactique [Schaaf, 2006]

▪ Alimentation

Une large partie de l'acide lactique est utilisée pour produire des agents émulsifiants utilisés en alimentation, particulièrement en boulangerie. Ces agents sont des esters de sels de lactate avec de longues chaînes d'acide gras. La production de ces agents nécessite un acide lactique stable à la chaleur.

L'acide lactique est également utilisé comme acidulant, agent de saveur, maintenant le pH ou inhibant le développement bactérien dans un grand nombre de produits alimentaires [Garde *et al.*, 2002] comme les bonbons, le pain ou les produits de boulangeries, les boissons gazeuses, la bière, la confiture et les gelées, la mayonnaise, les potages, les sorbets, les produits

laitiers, souvent en conjugaison avec d'autres acidulants. Il est aussi utilisé afin d'ajuster le pH des bains permettant le durcissement du cellophane, pour le conditionnement des aliments.

- **Désinfectants et détergents**

Une nouvelle application de l'acide lactique et de ses sels est dans la désinfection des carcasses, de la volaille et des poissons. On le retrouve aussi en tant que détergents dans les constructions.

- **Textile**

Il a longtemps été utilisé dans l'industrie du cuir comme acidulant pour le chaulage et le tannage. Il a aussi été utilisé dans les étapes de finition du textile. Actuellement, les acides inorganiques sont préférés, mais avec la production à faible coût annoncée de l'acide lactique et les restrictions environnementales, ces marchés pourront de nouveau être accessibles.

- **Pharmaceutiques et cosmétiques**

L'acide lactique et l'éthyl lactate ont longtemps été utilisés dans des applications et des formulations pharmaceutiques ou cosmétiques, particulièrement dans les onguents, les lotions, les solutions parentérales et des polymères biodégradables pour des applications médicales (comme les sutures chirurgicales, les prothèses, les dialyses et les drogues). Le sel d'acide lactique, réalisé avec le calcium, est employé dans la thérapie des insuffisances en calcium et comme agent contre les caries.

En cosmétique, l'éthyl lactate est la substance active dans les solutions anti-acné et est employé comme agent hydratant. Il s'avère souvent meilleur que les produits naturels.

A.3.3. L'acide polylactique (PLA)

Les biopolymères et les bioplastiques ne sont pas des produits récents. En effet, au milieu des années 1900, Henry Ford a inventé une méthode de fabrication de pièces d'automobile en plastique à partir de soja. Toutefois, la Seconde Guerre mondiale mit un frein à la production

de voitures à base de bioplastiques. De nos jours, ils redeviennent populaires et on les fabrique grâce à de nouvelles méthodes issues de la biotechnologie.

La demande actuelle en acide lactique a considérablement augmenté en raison de son utilisation comme monomère dans la production de polymères biodégradables d'acide polylactique (PLA) très prometteurs, et de son coût peu élevé comme matière première ou comme un intermédiaire de synthèse dans la fabrication de produits chimiques [Akerberg et Zacchi, 2000].

Les isomères L-lactate ou D-lactate ou un racémique peuvent être utilisés lors de cette polymérisation. Cependant les propriétés du polymère varieront en fonction de la pureté de l'acide lactique employé. En effet, une haute pureté optique est nécessaire afin d'obtenir une bonne cristallinité de l'acide polylactique suffisante, permettant une forte résistance aux forces mécaniques, chimiques et à la chaleur de ce polymère.

La forte résistance chimique de ce polymère est un avantage dans la fabrication des fibres, des tissus non tissés et des films alors que la résistance thermique convient pour la fabrication des couverts ainsi que des tasses et des plateaux trouvés dans la restauration.

Un éventail de propriétés peut également être obtenu en le copolymérisant avec d'autres monomères fonctionnels comme le glycolide, la caprolactone et le polyéther polyols. Les copolymères produits sont transparents ce qui est un facteur important pour leurs utilisations dans l'emballage des produits. Ils se dégradent lentement par l'hydrolyse (123 mois à 4°C et 3,5 jours à 70°C), permettant une bonne durée de conservation, laquelle peut être ajustée en faisant varier la composition et le poids moléculaire [Ajioka *et al.*, 1998].

Un autre de leurs avantages est qu'ils peuvent être utilisés en tant que solvants « écologiques » puisqu'ils possèdent différentes propriétés intéressantes : ils sont non toxiques, non volatiles à haute température et leurs composés sont dégradables. D'une manière générale, les propriétés de ces co-polymères se rapprochent de celles des polymères dérivés du pétrole, par exemple le polystyrène.

Actuellement, les PLA sont utilisés en tant que fibres dans la production de textiles, de produits hygiéniques non tissés comme les couches-culottes, d'édredons. Certaines industries réalisent

même des chaussettes à base de PLA. Ils sont employés en tant que plastiques dans le conditionnement des aliments sous forme de bouteilles, de fioles, de films afin d'emballer les fruits, les salades et les plats cuits au four, mais également dans la production de cartes, de téléphones et autres. Enfin, les PLA servent aussi dans des domaines variés par exemple en tant que sacs d'engrais, de pots pour les plantes [Schaaf, 2006].

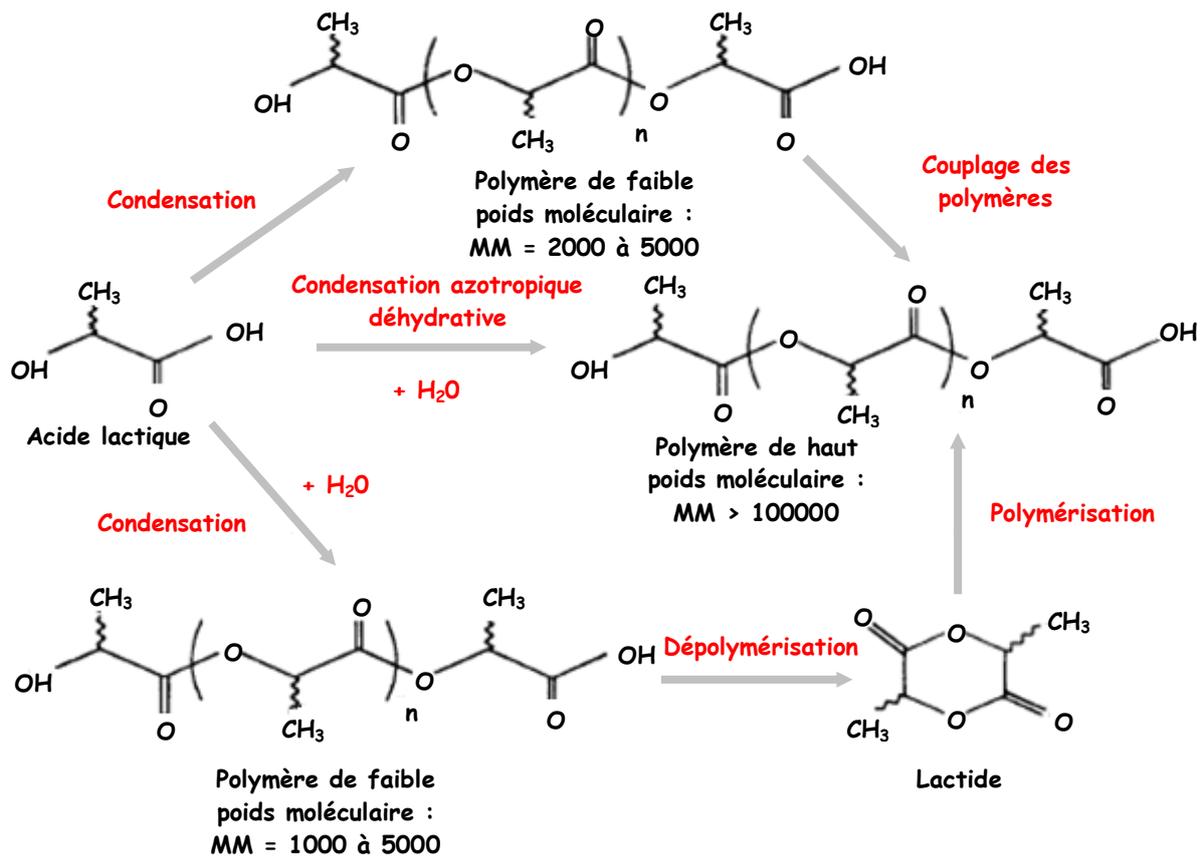


Figure 9 : Fabrication du polymère d'acides lactiques [Lunt, 1998].

B. Les fermentations lactiques

Afin de pouvoir utiliser les glucides obtenus à partir des résidus lignocellulosiques pour la production de la biomasse et la fermentation lactique, il est nécessaire que la souche envisagée dispose des voies métaboliques pour la transformation des C5 en biomasse et en acide lactique [Dien *et al.*, 2003]. Il n'existe pas de façon naturelle de souche capable de réaliser ces 2 voies de façon efficace. La plupart des souches disposent des voies pour ne faire que de la biomasse à partir de sucres en C5. Certaines espèces sont capables de réaliser les 2 voies, mais généralement l'une des voies est peu efficace et par conséquent, pose problème dans le cadre d'une utilisation industrielle.

En effet, le milieu industriel nécessite un micro-organisme adapté qui doit répondre à des exigences bien précises [Dien *et al.*, 2003].

Tableau 2 : Exigences pour la production d'acide lactique pour les micro-organismes [Narayanan *et al.*, 2004].

Caractéristiques	Exigences
Rendement acide lactique	> 90 % du rendement théorique
Tolérance à l'acide lactique	-
Production en acide lactique	-
Croissance rapide et besoins nutritifs faibles	formulation moyenne peu coûteuse
Croissance sur des hydrolysats non dilués	Résistance aux inhibiteurs
Résistances aux variations des conditions expérimentales	pH acide, variations de température ou températures élevées
Biomasse cellulaire	La plus faible possible
Co-produits de fermentation	négligeable

B.1. Les bactéries lactiques : Généralités

Onze genres bactériens figurent dans la catégorie des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* [Ercolini *et al.*, 2001;

Holzapfel *et al.*, 2001; Stiles et Holzapfel, 1997]. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne sont pas considérées comme des bactéries lactiques typiques, mais leur usage se répand en industrie laitière.

Les bactéries lactiques sont naturellement retrouvées chez l'homme [Pascual *et al.*, 2006 ; Lidbeck et Nord, 1993 ; Ohrrage et Nord, 2000 ; Ocaña *et al.*, 1999], les animaux [Morotomi *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Mota *et al.*, 2006], les aliments fermentés [Caplice et Fitzgerald, 1999 ; Chenoll *et al.*, 2006] et ont également été retrouvés dans le sol, l'eau, les engrais et les eaux d'égout [Holzapfel *et al.*, 2001].

Elles sont par conséquent utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Les genres *Lactococcus* (lait), *Lactobacillus* (lait, céréales, viandes, végétaux), *Leuconostoc* (végétaux, lait), *Oenococcus* (vin), *Pediococcus* (viande, végétaux) et *Streptococcus* (lait) sont les principaux membres de ce groupe [Klaenhammer *et al.*, 2002 ; Champagne, 1993]. Le rôle principal des bactéries lactiques est la production d'acide lactique et d'autres composés organiques à partir des sucres par fermentation qui influencent la texture, le goût et la qualité microbiologique des aliments [Singh *et al.*, 2006, de Vos et Hugenholtz, 2004 ; Caplice et Fitzgerald, 1999]

Depuis une dizaine d'années, un intérêt considérable s'est développé autour de l'utilisation de cultures lactiques qui ont des effets bénéfiques pour la santé ou "probiotiques" (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) pour des applications alimentaires, pharmaceutiques ou encore en alimentation animale [Schaafsma, 1996].

Plus récemment, les bactéries lactiques sont également employées dans la production de produits chimiques industriels et des produits biologiques comprenant les biopolymères (*Leuconostoc*), les enzymes (*Lactobacillus*), l'éthanol et l'acide lactique (*Lactobacillus casei*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*) [John *et al.*, 2006 ; Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000].

La taxonomie des bactéries lactiques a été basée sur la coloration Gram et il est possible de les classer suivant la nature des produits du métabolisme bactérien obtenus à partir des glucides [Tableau 3].

Tableau 3 : Caractérisation des bactéries lactiques [Batt, 1999]

Caractères	<i>Carno.</i>	<i>Lactobac.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lacto./ Vagno.</i>	<i>Leuco./ Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragen.</i>	<i>Weissella</i>
Formation en tétrade	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Production CO ₂ à partir du glucose	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
Croissance à 10°C	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-	-	+	+
Croissance à 45°C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
Croissance sur NaCl à 6,5%	ND	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-	+	+/-
Croissance sur NaCl à 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Croissance à pH 4,4	NS	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
Croissance à pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Acide lactique produit	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	L	D, DL

B.2. Le genre *Lactobacillus*

B.2.1. Généralités

Le genre *Lactobacillus* est, quantitativement, le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques. Les lactobacilles sont très hétérogènes et les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques et génotypiques variés. Cette variété se reflète dans le pourcentage de G+C qui peut aller de 32 à 53%, le spectre le plus large des bactéries lactiques. Elles sont considérées comme GRAS (Generally Regarded As Safe), Gram +, et présentent une réponse négative au test de la cytochrome oxydase, de la catalase et de la nitrate réductase [Euzéby, Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire, 2006 ; Falsen *et al.*, 1999].

Ces bactéries ont une morphologie en forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés) allant de 0,5 - 1,2 à 1-10 μm mais sous certaines conditions de croissance elles peuvent prendre une forme de coccobacilles, qui forment fréquemment des chaînes. Elles sont de formes régulières, non pigmentées, non sporulantes et non mobiles. Ce sont des souches généralement anaérobies facultatives, c'est-à-dire qu'elles poussent sous une atmosphère pauvre en oxygène et par conséquent leur métabolisme est fermentaire ; quelques espèces sont aéro-tolérantes et peuvent utiliser l'oxygène à l'aide d'enzymes (flavoprotéine oxydase), alors que d'autres sont strictement anaérobies [Kandler et Weiss, 1986].

Leur croissance est optimale pour une température de 30 à 40 °C et à un pH de 5,5-5,8. Cependant d'une manière générale, elles peuvent se développer à un pH inférieur à 5,0 et sur une gamme de température allant de 5-53 °C [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000 ; Batt, 1999].

De plus, ces organismes ont des besoins nutritifs complexes ce qui rend leur culture difficile et ces besoins vont varier d'une espèce à l'autre [Rogosa *et al.*, 1961; Aasen *et al.*, 2000 ; Charalampopoulos *et al.*, 2002]. En effet, les bactéries lactiques sont auxotrophes pour de nombreux facteurs de croissance comme [Dellaglio *et al.*, 1994 ; Fitzpatrick et O'Keefe, 2001] :

- les acides aminés ;
- les peptides ;
- les vitamines ;

- les dérivés d'acides nucléiques ;
- les sels minéraux ;
- les esters d'acides gras ;
- et les hydrates de carbone.

En plus des caractéristiques de croissance en rapport aux différentes températures, aux pH et aux concentrations en sel, d'autres facteurs sont utilisées pour distinguer les *Lactobacillus* tels que :

- les différentes voies de fermentation des hydrates de carbone ;
- l'hydrolyse de l'arginine ;
- le contenu du peptidoglycane ;
- l'homologie des séquences ARNr-16S. Comme avec beaucoup d'arrangements taxonomiques l'utilisation de ces séquences est de plus en plus regardée comme définitive. Au cours de l'évolution, certains fragments des gènes codant pour les ARNr-16S ont subi très peu de variations. Un avantage de l'utilisation des ribosomes est que tous les organismes en possèdent. La comparaison des séquences de nucléotides de ces fragments peut donc être utilisée pour établir les relations phylogéniques (et donc taxonomiques) entre bactéries. Grâce à ces techniques on peut ainsi fabriquer l'arbre phylogénétique qui reflète les relations évolutives supposées dans un groupe d'espèces [Figure 10].

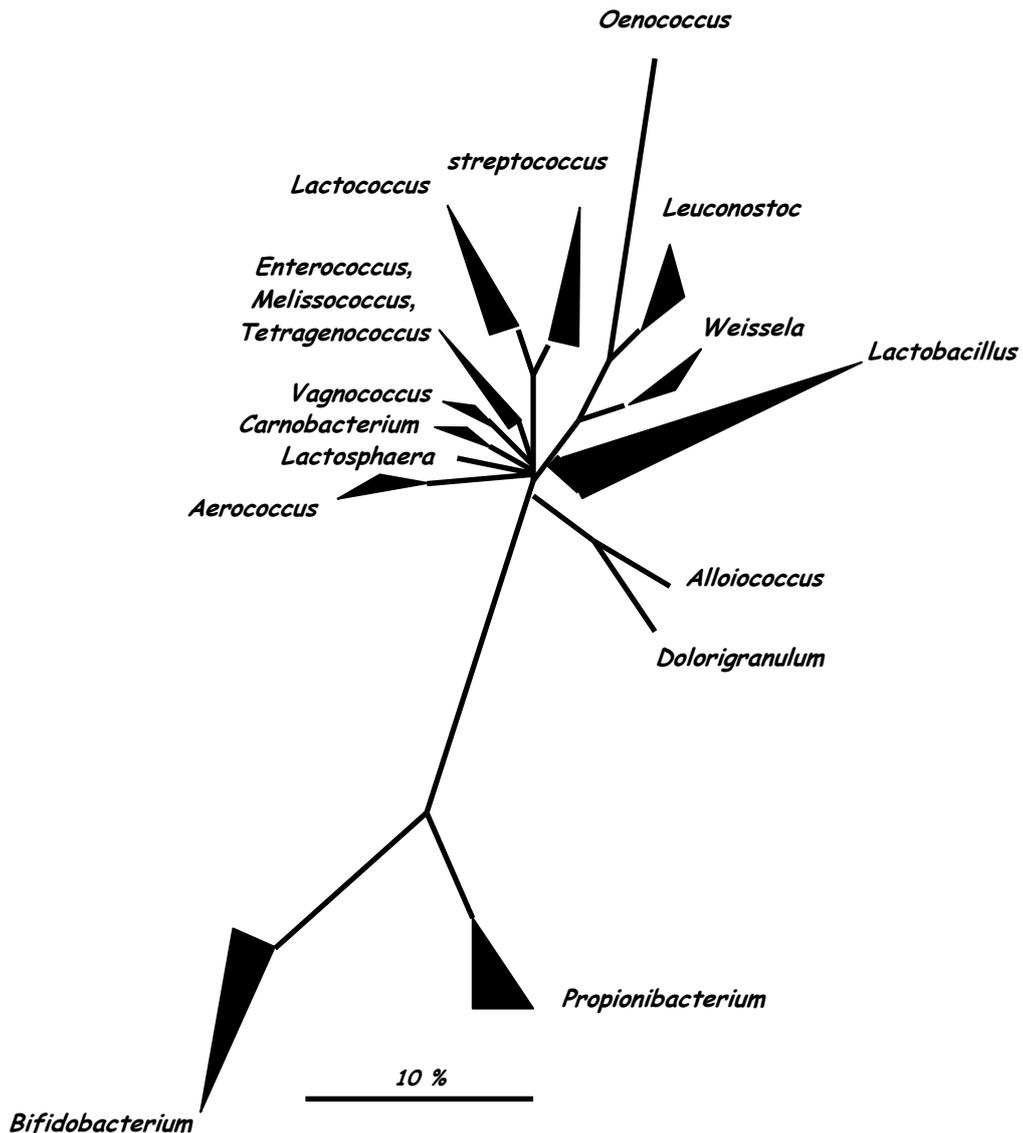


Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse comparative du gène ARN-16S, montrant les principaux groupes phylogénétiques de bactéries lactiques avec le pourcentage G+C dans l'ADN et les bactéries Gram + du genre *Bifidobacterium* et la *Propionibacterium* [Holzapfel *et al.*, 2001].

B.2.2. Importance pour l'industrie alimentaire

Étant donné la diversité des propriétés métaboliques présentées par les membres du genre *Lactobacillus* ces bactéries ont été trouvées dans un certain nombre de produits alimentaires fermentés. Dans ces produits, les lactobacilles contribuent principalement à leur conservation et leur saveur de nutrition. Ces souches sont ajoutées en tant que démarreurs délibérés ou participent à la fermentation en raison de leur présence en tant que contaminants naturels des substrats.

Une autre propriété des lactobacilles qui est devenue plus appréciée est leur capacité de produire des bactériocines [Klaenhammer, 1988]. Les bactériocines ont probablement évolué pour fournir à la souche productrice un avantage sélectif dans une place microbienne complexe. L'incorporation des espèces de *Lactobacillus* comme démarreurs ou l'inclusion d'une préparation épurée ou sémi-purifiée de bactériocine comme ingrédient dans un produit alimentaire peut fournir une marge de sûreté en empêchant la croissance de microorganismes pathogènes.

B.2.3. Importance pour le consommateur

Beaucoup d'attention a été orientée sur leur rôle potentiel comme probiotiques. Les souches qui ont été examinées pour leurs effets probiotiques incluent *L. acidophilus* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *Lactobacillus GG*, *L. gasseri*, *L. casei* CAD de Shirota et *L. reuteri*. Les effets cliniques rapportés et attribués à la consommation de *Lactobacillus* se composent de l'amélioration de l'immunité, d'une diminution de l'activité enzymatique fécale, empêchant des désordres intestinaux et réduisant la diarrhée virale. La plupart des souches probiotiques sont censées avoir la capacité de coloniser la région intestinale et d'affecter la flore microbienne et pourraient avoir un rôle sur l'exclusion de la colonisation par des microbes pathogènes.

B.3. Les différentes voies fermentaires

Les deux voies métaboliques majeures pour l'assimilation des hexoses et des pentoses chez les bactéries lactiques sont la voie d'Embden-Mayerhof-Parnas et la voie des pentoses phosphates.

En 1919, Orla-Jensen a proposé de diviser le genre en trois sous-genres : "*Thermobacterium*", "*Streptobacterium*" et "*Betabacterium*". Cette nomenclature n'a pas été validée et retenue par les *Approved Lists of Bacterial Names*, et par conséquent elles n'ont pas de statut dans la nomenclature.

La classification de Orla-Jensen ne correspondait à aucune réalité taxonomique toutefois, elle est toujours utilisée en pratique même si les noms des sous-genres sont remplacés par des qualificatifs illustrant les caractéristiques de la fermentation.

Tableau 4 : Classification des groupes des *Lactobacillus* [Salminen *et al.*, 1998].

Caractères	Groupe I Homofermentaires	Groupe II Hétérofermentaires facultatifs	Groupe III Hétérofermentaires obligatoires
Fermentation pentoses	-	+	+
Glucose → CO ₂	-	-	+
Gluconate → CO ₂	-	+	+
FDP Aldolase	+	+	-
Phosphoketolase	-	+	+
Souches	<i>L. acidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i>	<i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sake</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. reuteri</i>

Ainsi, on distingue dans le [Tableau 4](#) trois groupes de bactéries lactiques classées en fonction de leurs caractéristiques fermentaires [Kandler et Weiss, 1986 ; Bustos *et al.*, 2005] :

- Les *Lactobacillus* homofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Thermobacterium*) qui utilisent le glucose grâce à la voie homofermentaire d'Emden-Meyerhof-Parnas. Leur seul produit final étant l'acide lactique (R ou S - D ou L). Ils ne métabolisent pas les pentoses et ne dégagent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose ou du gluconate. La production en acide lactique est supérieure à 85% à partir du glucose [Figure 11] ;

- les *Lactobacillus* hétérofermentaires stricts (ancien sous-genre : *Betabacterium*) qui fermentent le glucose en acide lactique, CO₂ et acide acétique ou éthanol via la voie hétérofermentaire de la 6-phosphogluconate déshydrogénase/phosphocétolase et qui dégradent les pentoses en acide acétique et en acide lactique via la voie hétérofermentative de la glycéraldéhyde-3-phosphate/pyruvate kinase/lactate déshydrogénase. Ces bactéries produisent du CO₂ lors de la fermentation du glucose et du gluconate. La production en acide lactique est d'environ 50% avec des quantités importantes en acide acétique, éthanol et CO₂ ;

- les *Lactobacillus* hétérofermentaires facultatifs (ancien sous-genre : *Streptobacterium*) peuvent changer de voie en fonction du substrat. Ils métabolisent le glucose en acide lactique grâce à la voie homofermentaire d'Emden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. Ils ne produisent pas de CO₂ lors de la fermentation du glucose, mais ils en produisent lors de la fermentation du gluconate.

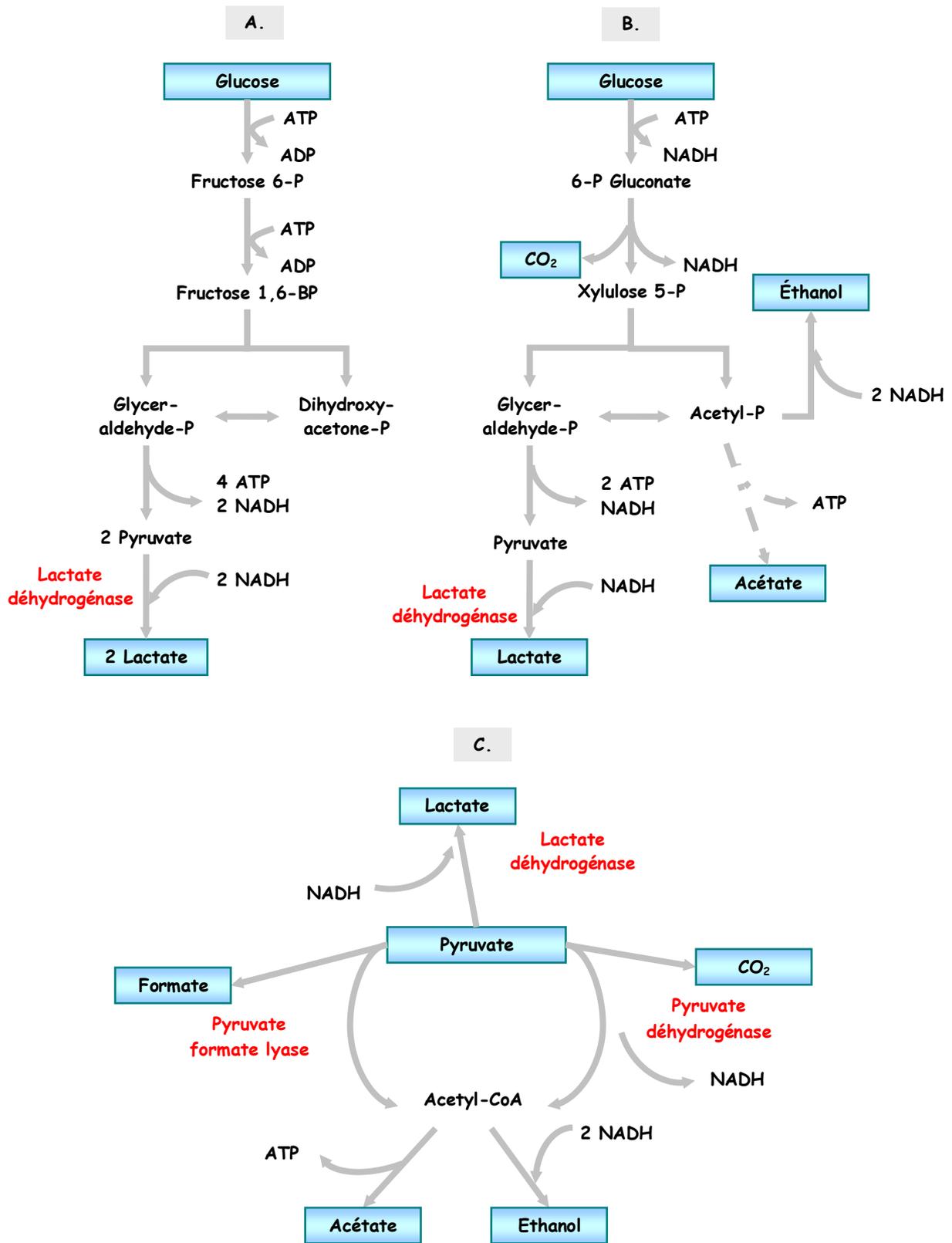


Figure 11 : Différentes voies fermentaires retrouvées chez les bactéries lactiques. **A** - Fermentations homofermentaires, **B** - hétérofermentaire stricte et **C** - hétérofermentaire facultative (C) [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000].

Les produits finaux de la fermentation lactique dépendent de la composition chimique du substrat (contenu en sucres, présence d'accepteurs d'électrons, disponibilité en azote) et des conditions environnementales (pH, température, mode respiratoire : aérobie/anaérobie) [Charalampopoulos *et al.*, 2002].

En culture homofermentaire, 1 mole de glucose permettra donc théoriquement de donner 2 moles d'acides lactiques et 2 moles d'ATP, tandis qu'en culture hétérofermentaire stricte, 1 mole de xylose ou d'arabinose donnera théoriquement 1 mole d'acide lactique et 1 mole d'acide acétique ou d'éthanol et donnera 1 mole de CO₂ en plus pour la fermentation d'une mole de glucose.

B.4. Transport du xylose et de l'arabinose

Le transport et la régulation des glucides à travers la membrane influent sur la productivité de la fermentation. Les microorganismes peuvent utiliser la diffusion passive ou active pour ce transport. Cependant, il existe des exceptions en effet de nombreux transports du xylose sont basés sur la diffusion facilitée de type symport à proton chimio-osmotique et sont pH dépendants. Dans de nombreux cas, le système de transport du xylose n'est pas spécifique du xylose et est en compétition inhibitrice avec d'autres systèmes de transport de glucides tels que celui du glucose [Wyman, 1996]. Dans la cas de l'arabinose, *E. coli* et *Bacillus subtilis* possèdent différents systèmes permettant le transport de ce glucide : le symport à proton (*araE*) ou la protéine de fixation dépendante (*araFGH*) [Sa-Nogueira *et al.*, 1997 ; Khlebnikov *et al.*, 2000].

Tableau 5 : Système de transports du xylose [Wyman, 1996].

Souches	Type de transports
Bactéries	
<i>E. coli</i> <i>Staphylococcus xylosus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Symport à proton
Levures	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Rhodotorula sp.</i> <i>Candida shehatae</i> <i>Pichia stipitis</i>	diffusion facilitée aérobie symport à proton symport à proton Symport à proton

B.5. Les différents types de fermentation

L'avantage de la fermentation par rapport à la voie chimique est comme nous l'avons expliqué dans la [Partie A.3.1](#) est que l'on peut obtenir un acide lactique optiquement pur.

Cependant, quelques problèmes sont rencontrés lors de la production d'acide lactique :

- L'étape de fermentation nécessite un contrôle du pH et l'ajout d'un agent de titration comme le carbonate de calcium, l'hydroxyde de sodium ou l'hydroxyde d'ammonium conduisant à la formation de lactate ;
- l'acide lactique est un inhibiteur de croissance ce qui rend difficile sa production à haute concentration ;
- lors de la reconversion du lactate en acide lactique, des co-produits indésirables peuvent être produits comme le sulfate de calcium ;
- lorsque l'acide lactique est soumis à de fortes températures ou de fortes concentrations, il peut se polymériser ce qui complique sa reconversion par les techniques conventionnelles telles que l'évaporation.

B.5.1. La fermentation en milieu liquide

Ce type de fermentation est la méthode la plus couramment utilisée pour la production d'acide lactique à partir de différentes sources carbonées tels que le lactose, le saccharose, les mélasses [[Ohashi et al., 1999](#)] mais également l'amidon [[Ohkouchi et Inoue, 2006](#) ; [Anuradha et al., 1999](#)] et la cellulose [[Abe et Takagi, 1991](#) ; [Venkatesh, 1997](#)].

Pour les deux derniers substrats cités, l'amidon et la cellulose, ils présentent un intérêt tout particulier en raison de leur forte abondance dans les ressources renouvelables comme les céréales. Cependant, dans le cas de l'amidon et de la cellulose, ils doivent être dans un premier temps dégradé en glucose avant d'être métabolisable, ce que les bactéries lactiques sont très rarement capables de réaliser. L'hydrolyse est réalisée à l'aide d'amylases dans le cas de l'amidon [[Anuradha et al., 1999](#)] et de cellulases pour la cellulose [[Abe et Takagi, 1991](#) ; [Venkatesh, 1997](#)].

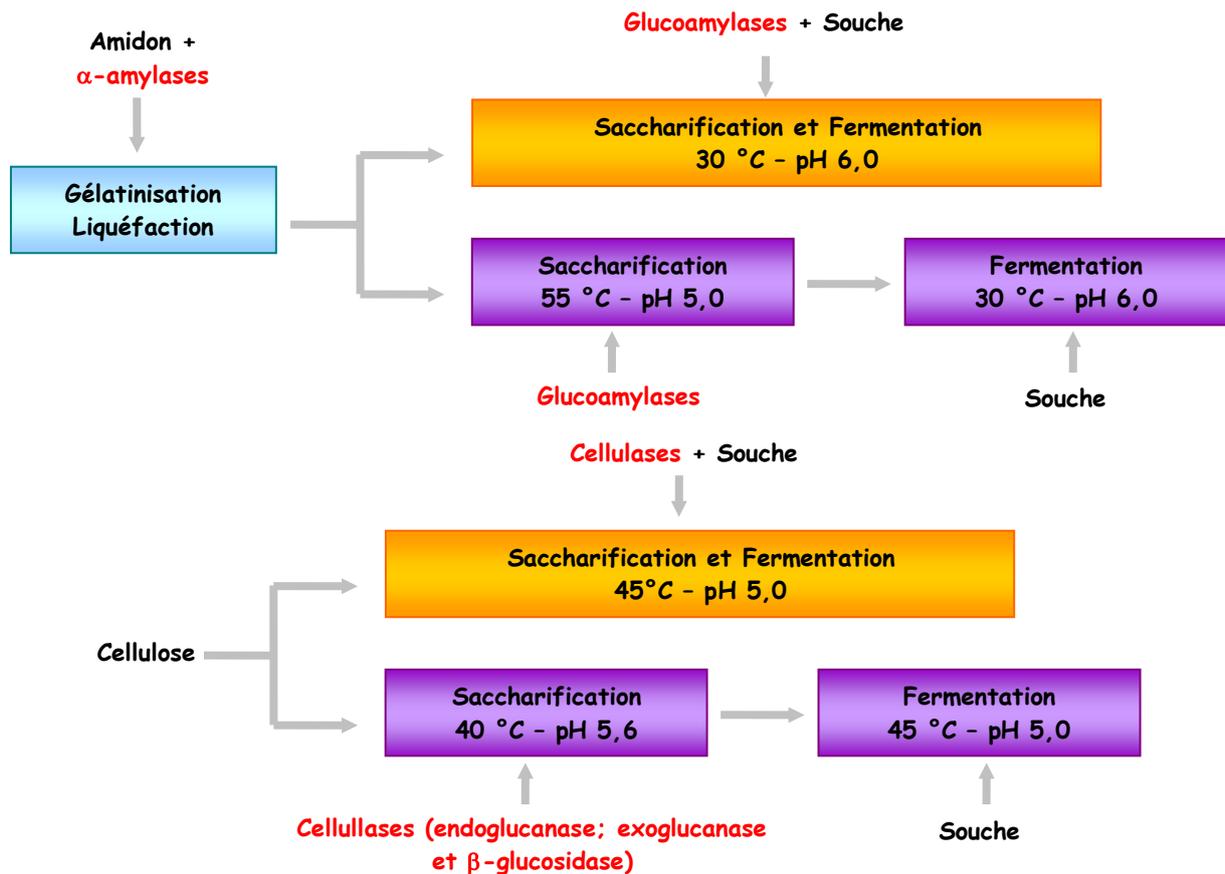


Figure 12 : Procédé de saccharification et fermentation simultanée à partir d'amidon et de cellulose [Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000 ; Venkatesh, 1997].

Ce processus en deux étapes comportant l'hydrolyse enzymatique suivie de la fermentation microbienne rend l'amidon et la cellulose comme substrat de fermentation économiquement sans attrait. Cette conversion microbienne de l'amidon et de la cellulose en acide lactique peut être rendue beaucoup plus économique en couplant l'hydrolyse enzymatique des substrats et la fermentation du glucose, en une seule étape. Un avantage direct de ce procédé simultané de saccharification et de fermentation (SSF) est une diminution de l'inhibition provoquée par l'accumulation de glucose menant à une augmentation des taux de saccharification et à une réduction conséquente en volume de réacteur et frais financiers.

B.5.2. La fermentation en milieu solide

La fermentation en milieu solide présente de nombreux avantages [Tableau 6] vis-à-vis de la production d'enzymes et de produits chimiques de biomasse produits à partir des souches fongiques par rapport à la culture en milieu liquide [Couto et Sanroman, 2006].

Tableau 6 : Avantages et inconvénients de la fermentation en milieu solide (FMS) par rapport à la fermentation en milieu liquide (FML).

Avantages	Inconvénients
Haute productivité	Difficulté des mesures
Meilleure régulation de l'oxygène	Difficulté de mélange
Faible coût du milieu	Difficulté de contrôle des paramètres du procédé (pH, T°C, besoins en nutriments...)
Facilité de préparation	difficulté d'homogénéisation de la chaleur
Réduction des besoins en énergie et en nutriments	Produit final non pur, augmentation du coût pour récupération du produit final
Technologie simple	Maîtrise des contaminants
ressemblance avec l'habitat naturel des microorganismes	

C'est dans ce cadre que [Socol et al. \[1994\]](#) ont étudié la production de l'acide L-lactique par la souche fongique *Rhizopus orizae* sur milieu solide à partir de la bagasse de canne à sucre. Ils ont ainsi obtenu une productivité légèrement plus élevée que sur la culture en milieu liquide.

Cependant, ces dernières années des recherches sur la culture en milieu solide à partir des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* ont été réalisées. [Richter et Träger \[1994\]](#) ont testé la bactérie *Lactobacillus paracasei* pour la production d'acide L-lactique sur sorgho doux comme substrat. Plus récemment, [Naveena et al. \[2005\]](#) ont rapporté la production d'acide L-lactique par la souche *Lactobacillus amylophilus* GV6 dans des conditions de SSF sur son de blé et [John et al. \[2006\]](#) ont cherché à fermenter les résidus provenant du manioc et de la canne à sucre à partir de la souche *Lactobacillus delbrueckii*.

B.5.3. L'immobilisation

Une autre approche pour la production d'acide lactique a consisté à immobiliser les cellules des bactéries lactiques à l'aide d'une matrice, la plus couramment utilisée étant l'inclusion à partir de l'alginate de sodium [[Yan et al., 2001](#) ; [Klinkenberg et al., 2001](#) ; [Yoo et al., 1996](#)]. La méthode d'immobilisation des cellules permet de maintenir une concentration élevée en biomasse cellulaire et d'améliorer les taux de production d'acide lactique tout en réduisant les besoins complexes en nutriments des bactéries lactiques au niveau du milieu de culture et les inhibitions rencontrées lors de la fermentation [[Idris et Suzana, 2006](#)]. Un autre avantage est que l'activité

est conservée pendant plusieurs semaines et après plusieurs cultures répétées [Roukas et Kotzekidou, 1998].

Pour la production d'acide lactique par cellules immobilisées, le type de matrice et de réacteur sont une considération importante en raison de la nécessité de réguler le pH. L'utilisation d'un réacteur avec une agitation permet de maintenir efficacement le pH, mais mène souvent à l'usure de la matrice [Guoqiang *et al.*, 1992], tandis que dans des réacteurs à couche entassée, de grands gradients de pH sont produits et toutes les cellules immobilisées ne sont pas au pH optimal pour la production d'acide lactique [Boyaval et Goulet, 1988]. De plus lors de la fermentation, la multiplication des bactéries au sein de la matrice mène à la libération d'une partie des cellules et on va donc retrouver des cellules également dans le bouillon de culture [Senthuran *et al.*, 1999].

Le problème majeur retrouvé au niveau de méthode est que l'inclusion à partir d'une matrice d'alginate est chimiquement instable en contact avec divers agents chélatants de cations tels que le phosphate, le citrate et le lactate lesquels peuvent causer une rupture ou une dissolution des billes formées [Yoo *et al.*, 1996].

B.6. Construction de souches productrices d'acide lactique

Ces dix dernières années avec l'avancé de la biologie moléculaire, de nombreuses études ont été réalisées sur la construction de souches, telles que les bactéries lactiques, la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Rhizopus orizae*, afin d'améliorer le rendement en acide lactique. Cependant, ces travaux ne concernent que les fermentations effectuées sur des concentrations élevées en glucose.

Tableau 7 : Construction de différentes souches pour améliorer la production d'acide lactique. [Singh *et al.*, 2006]

Souche	Modifications	Résultats	Rendement/ Concentration	Références
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	<i>ldhD</i>	Pas d'amélioration	-	Bhowmik et Steele, 1994
<i>L. plustanm</i> DG301	<i>ldhL</i>	Pas d'amélioration	15,6 +/- 1,0 g/L lactate	Ferain <i>et al.</i> , 1994
<i>L. lactis</i>	augmentation nombre lac opéron	légère augmentation de la production d'acide lactique	-	Davidson <i>et al.</i> , 1996
<i>S. cerevisiae</i>	clonage <i>ldh</i> et délétion PDC	augmentation rendement lactate	11,36 g/L	Adachi <i>et al.</i> , 1998
<i>K. lactis</i>	clonage gène <i>ldh</i> bovin	rendements améliorés d'acide lactique	109 g/L	Porro <i>et al.</i> , 1999
<i>L. helveticus</i> CNRZ32	délétion <i>ldhD</i>	production seulement acide L-lactique	50,64 g/L	Nikkila <i>et al.</i> , 2000
<i>R. orizae</i>	mutagénèse	rendements améliorés d'acide lactique	79,4 g/L	Bai <i>et al.</i> , 2004
<i>S. cerevisiae</i>	<i>ldhA</i> de <i>R. orizae</i>	production d'acide lactique	38 g/L	Skory, 2003
<i>R. orizae</i>	construction <i>ldhA</i> pour expression	augmentation rendement acide lactique	72,8-76 g/L	Skory, 2004
<i>S. cerevisiae</i>	délétion PDC	homofermentation lactate	1,66 mole lactate/ mole glucose	Van Maris <i>et al.</i> , 2004
Wine yeast strain	expression <i>ldhL</i> bovine	production L-lactate	122 g/L	Saitoh <i>et al.</i> , 2005

B.6.1. *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces lactis*

La souche fongique *Saccharomyces cerevisiae* est couramment utilisée pour la production d'éthanol, de biomasse, de protéines de recombinaisons, de produits pharmaceutiques au niveau industriel et est connue pour être un micro-organisme tolérant aux pH acides, par conséquent la production d'acide lactique peut être réalisée à un pH plus faible [Dequin et Barre, 1994 ; Porro *et al.*, 1995]. Cependant, lors de la fermentation alcoolique réalisée par *S. cerevisiae*, l'acide lactique n'est produit que sous forme de traces de 0,2 à 0,4 g/L [Witte *et al.*, 1989].

La différence principale entre les processus métaboliques du *S. cerevisiae* et les bactéries lactiques est la manière dont le pyruvate est converti par le système final d'accepteur d'électron pour la génération de NAD. Dans un cas chez la levure, le pyruvate (produit par la glycolyse) est converti en acétaldéhyde et CO₂ par l'intermédiaire de la pyruvate décarboxylase (PDC) et ensuite en éthanol par l'intermédiaire de l'alcool déshydrogénase (ADH). Dans l'autre

cas chez les bactéries lactiques, le pyruvate est converti en lactate par l'intermédiaire de la NAD-dépendante Lactate déshydrogénase (LDH).

Différentes études ont donc été réalisées, afin de construire plusieurs types de plasmide contenant le gène structural de LDH, qui ont été alors transférés dans la souche *S. cerevisiae*. Cependant la souche *S. cerevisiae* ainsi recombinée continuait à produire une quantité significative d'éthanol, réduisant le rendement du lactate, la suite du travail a donc consisté en la délétion des gènes régulant l'activité pyruvate décarboxylase (PDC1, PDC5 et PDC6) pour réduire au minimum la production d'éthanol [Adachi *et al.*, 1998].

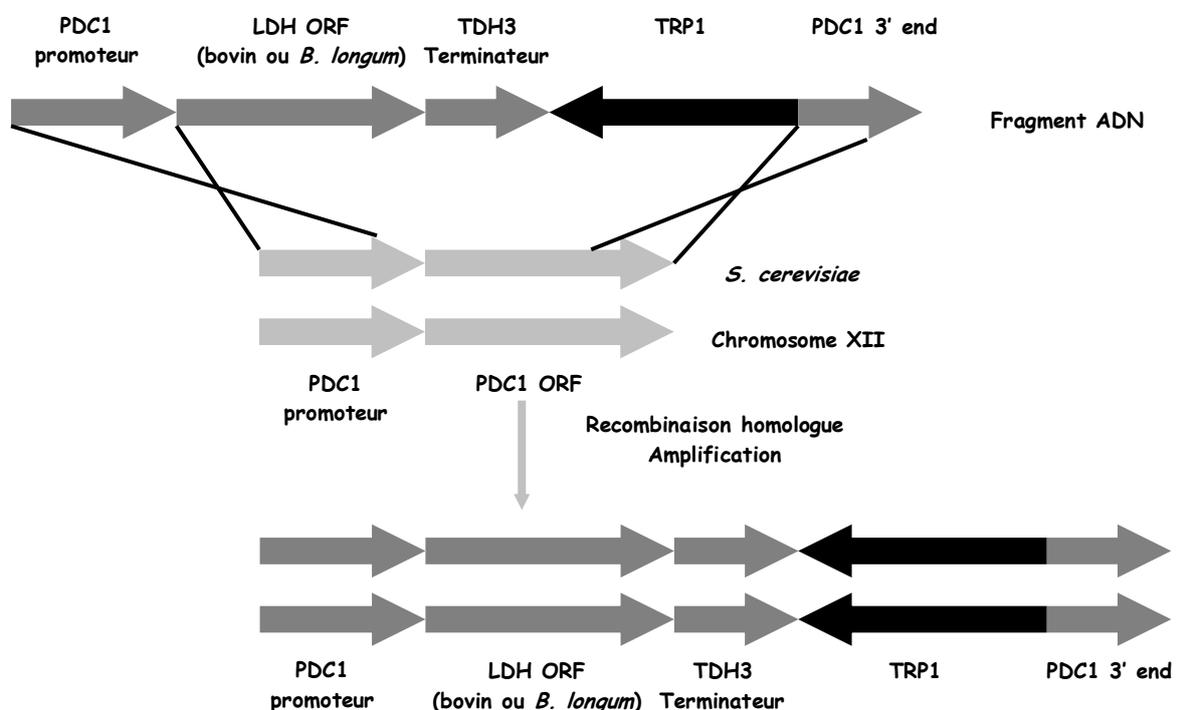


Figure 13 : Méthode pour l'expression du gène LDH. (a) Le vecteur construit est intégré au niveau du locus PDC1 du chromosome XII de *S. cerevisiae* par recombinaison homologue. (b) Premièrement, une copie de la cible LDH est introduite, la souche OC-2T. Deuxièmement, la diploïdisation s'est produite par la formation de spore. Le LDH introduit est amplifié en deux copies, et la région codant pour PDC1 est inhibée.

Au niveau de l'intégration du gène LDH différents travaux ont également été menés selon l'acide lactique final désiré c'est-à-dire sous sa forme D- ou L-. Selon le cas le gène LDH-A isolé de *Rhizopus orizae* [Skory *et al.*, 2000] d'origine bovine ou L-LDH isolé de la souche *Bifidobacterium longum* donnant comme produit final de l'acide L-lactique [Ishida *et al.*, 2005] ou le gène D-LDH provenant de la souche *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NBRC3426 donnant de

l'acide D-lactique [Ishida *et al.*, 2006] a donc été intégré à différents plasmides selon les études sous le contrôle du promoteur PDC1, avec le gène PDC1 inactivé.

Porro *et al.* [1999] ont eux réalisés des travaux sur le même principe à partir de la levure *Kluyveromyces lactis* qui ne possède qu'un seul gène de régulation de la pyruvate décarboxylase (PDC1) et ne réalise pas d'effet Crabtree.

B.6.2. *Rhizopus orizae*

L'utilisation de champignons, tel que *Rhizopus orizae*, pour la production d'acide lactique présente un intérêt, car elle ne requiert pas de sources d'azotes inorganiques, utilise les glucides tel que les hexoses ou les pentoses et est facilement séparable du milieu de culture lors des procédés de purification de l'acide lactique [Miura *et al.*, 2003 ; Magnuson et Lasure, 2004].

L'acide lactique est produit en condition aérobie, le processus exige l'agitation et l'aération comme pour les autres processus fongiques de production d'acide organique. Une différence avec les procédés utilisant *Aspergillus niger* est que la croissance et la fonction métabolique de *R. orizae* est inhibée pour un pH inférieur à 4,5, de plus sa stratégie pour acidifier le milieu semble également être distincte. Par conséquent la neutralisation continue de la fermentation est exigée pour réaliser le rendement actuellement maximal de 80 g/L [Yin *et al.*, 1998]. La sensibilité au pH et la tendance pour la croissance filamenteuse compliquent le processus et augmentent les coûts. De plus, le principal inconvénient du processus de *R. oryzae* est la déviation du carbone loin du produit désiré tel que les sous-produits comme l'éthanol et l'acide fumarique [Litchfield, 1996].

Des efforts récents de recherches ont été concentrés pour détecter des mutants capables de produire seulement de l'acide L-lactique à partir d'amidon avec des rendements élevés [Bai *et al.*, 2004]. La recherche pour l'amélioration du procédé a inclus de cloner les gènes de la lactate déshydrogénase de cette souche chez *E. coli* [Skory, 2000].

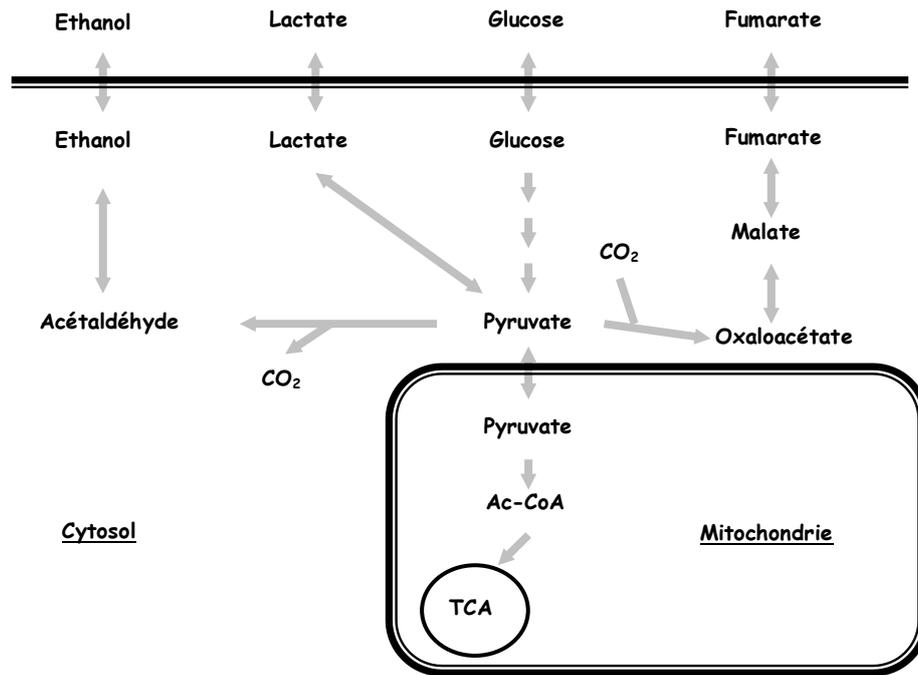


Figure 14 : Voie de synthèse des acides organiques chez *Rhizopus oryzae*.

B.6.3. *Escherichia coli* recombiné

La souche *E. coli* a été modifiée pour réaliser une production efficace de l'acide D- et L-lactique. La souche *E. coli* produisant de l'acide L-Lactique est un mutant incluant un *ptsG*-negatif mais qui est glucose-positif qui porte des mutations sur les gènes codant pour PFL et D-LDH et exprime le gène codant pour L-LDH. Cette souche a la capacité de fermenter simultanément les hexoses et les pentoses, et de plus ne produit pas d'acétate, de formate, d'éthanol ou de D-lactate mais produit du L-lactate à partir d'un mélange de glucides avec un rendement de 0,77 g/g pour une concentration excédant 800 mM.

Une approche similaire au niveau de la production d'acide D-lactique optiquement pur a été réalisé sur la souche *E. coli* délestée des gènes codant pour PFL, FR, ADH et AK, et possède soit l'activité D-LDH (souche SZ63) ou L-LDH (souche SZ85) [Zhou *et al.*, 2003]. Afin d'augmenter la gamme de substrats utilisables, un cluster des gènes du sucrose (codant pour une invertase, une fructokinase, un symport d'anions et un répresseur) a été introduit chez la souche *E. coli* SZ63 et présente une production de plus de 500 mM d'acide D-lactique à partir du saccharose et de mélasses avec un rendement de 0,94 g/g [Shukla *et al.*, 2004]. Cependant, pour des

concentrations élevées (> 50 g/L) la souche est incapable de métaboliser complètement les glucides.

Par conséquent, une sélection de mutants, possédant toutes les modifications présentes chez la souche *E. coli* SZ63 et ayant la capacité de fermenter naturellement le saccharose, a été clonée [Zhou *et al.*, 2005]. Sur un milieu minimal contenant 10% de glucose (p/v), cette souche produit plus de 700 mM d'acide D-lactique et les rendements sont compris entre 0,88 et 0,95 g/g glucose.

Des études récentes ont permis d'observer l'effet positif sur la production de l'acide D-lactique suite à l'inactivation des gènes codant pour la NADH-deshydrogenase (gènes *ndh* et *nuo*) et qui serait par conséquent l'étape suivante afin d'altérer la voie d'utilisation du NADH pour la souche modifiée d'*E. coli* [Yun *et al.*, 2005 ; Wendisch *et al.*, 2006]. L'un des problèmes majeurs au niveau de cette souche est qu'*E. coli* ne tolère pas un pH trop acide ce qui nécessite une neutralisation en continu avec CaCO₃, NaOH ou NH₄OH [Ishida *et al.*, 2006].

B.6.4. *Lactobacillus* recombiné

L'expression des gènes D-LDH et L-LDH correspondant à la production d'acide D- et L-lactique a été étudiée chez *L. helveticus* CNRZ32. Afin de développer une souche produisant de l'acide L-lactique pur, deux souches *ldhD*-négatives à partir de *L. helveticus* CNRZ32 ont été construites par remplacement de gène.

Une des souches a été construite en supprimant la région promotrice du gène D-LDH, et l'autre a été construite en remplaçant le gène structural de D-LDH avec une copie additionnelle du gène structural (L-LDH) de la même espèce. Les souches ainsi modifiées ont été nommées respectivement GRL86 et GRL89. Pour la souche GRL89, la deuxième copie du gène structural de L-LDH a été exprimée sous le promoteur de D-LDH. Les deux souches négatives de D-LDH ont produit seulement l'acide L-lactique avec une quantité égale au lactate produit par le type sauvage. L'activité maximale L-LDH s'est avérée 53 et 93% plus haut dans GRL86 et GRL89, respectivement, que par rapport à la souche de type sauvage. La production d'acide L-lactique par la souche GRL89 a été optimisée en utilisant l'étude statistique et la méthode de surfaces des réponses. La température et des optimums de pH se sont avérés être 41 °C et pH 5,9. À pH

faible, quand la croissance et la production d'acide lactique sont désaccouplées, la souche GRL89 produit approximativement 20% de plus d'acide lactique que la souche GRL86 [Singh *et al.*, 2006].

B.6.5. Les systèmes vectoriels

Le [Tableau 8](#) décrit une partie des systèmes vectoriels utilisés pour modifier les souches bactériennes lactiques et la levure *S. cerevisiae* et montre également les promoteurs forts utilisés pour l'expression des gènes désirés. Diverses tentatives ont été réalisées afin de développer des systèmes vectoriels efficaces au niveau métabolique des LAB.

Tableau 8 : Développement de systèmes vectoriels pour la construction de souches.

Vecteurs	Caractéristiques	Références
pLAB1301	Em ^r , Cm ^r shuttle vector <i>Escherichia coli</i> - <i>L. plantarum</i>	Josson <i>et al.</i> , 1989
pGIT005	Em ^r , pJDC9 with a 1.65 kb Alu I fragment from <i>L. plantarum</i> DG301 containing <i>ldhL</i>	Ferain <i>et al.</i> , 1994
pGIT032	Em ^r , Cm ^r , pLAB1301 with a 1.45 kbp Kpn I fragment from pGIT005 containing <i>ldhL</i>	Ferain <i>et al.</i> , 1994
pSA3	Shuttle vector <i>E. coli</i> /Streptococcus by joining pACYC184 and pGB305, Cm ^r , Tet ^r , Em ^r , Ts replicon	Bhowmik et Steele, 1994
pADNS	<i>adh1</i> promoter, <i>ldhA</i>	Adachi <i>et al.</i> , 1998
pEPL2	KIPDC1 promoter, URA3 marker	Porro <i>et al.</i> , 1999
pKTH2154	<i>ldhD</i> construct in pSA3	Nikkila <i>et al.</i> , 2000
pKTH2156	<i>ldhD</i> promoter and <i>ldhL</i> in pJDC9	Nikkila <i>et al.</i> , 2000
pMSP3535	Em ^r , pAMB1 and colE1 replicons, nisRK, PnisA	Bryan <i>et al.</i> , 2000
pldhA48X11	<i>ldhA</i> gene	Skory, 2003
pUI100	pJDC9, <i>ldhD-ldhL</i> , Em ^r , PnisA, nisR and nisK	Weeks et Yuksel, 2004
γEPLDH	TPII promoter with <i>ldh</i> gene	van Maris <i>et al.</i> , 2004

À l'heure actuelle, les vecteurs modifiés disponibles dans le commerce présentent des promoteurs, des terminateurs et l'addition des gènes d'intérêt avec différents marqueurs de choix appropriés au système désiré [Bhowmik et Steele, 1994 ; Adachi *et al.*, 1998 ; Nikkila *et al.*, 2000 ; Skory, 2003] ont été employés pour des études de production d'acide lactique. En outre, plusieurs améliorations associées aux bactéries lactiques ont impliqué les plasmides indigènes [de Vos *et al.*, 1994] et des vecteurs pour différentes bactéries lactiques ont été développés sur

la base de ces plasmides indigènes [Mercenier *et al.*, 2000]. Les systèmes utilisant des plasmides se fondent sur des marqueurs de sélection. Cependant les souches utilisées pour les applications de catégorie alimentaire ne doivent pas contenir des marqueurs de sélections de types antibiotiques ou des systèmes induisibles d'expression de gènes.

B.7. Purification de l'acide lactique

La principale difficulté économique de la fermentation réside dans les étapes de séparation et de purification de l'acide lactique. En effet, la fermentation microbienne exige l'utilisation d'un processus d'extraction efficace et économique pour purifier et récupérer l'acide lactique présent dans le milieu de fermentation [Reimann, 2005 ; Lee K.B., 2005]. Le rétablissement de l'acide lactique est complexe en raison de son comportement chimique, car il montre une forte affinité avec l'eau et possède une basse volatilité (122 °C à 1661,73 Pa). Par conséquent, sa purification est l'étape de transformation qui représente le coût le plus élevé [Gonzalez *et al.*, 2006]. De plus, la fermentation conventionnelle produit des sels de lactate. Quand ils sont acidifiés dans le processus d'extraction de l'acide lactique, le sulfate de calcium sera formé comme sous-produit, entraînant la génération de déchets [Sun *et al.*, 2006].

Le développement et le déploiement de nouvelles technologies de séparation permettent une production à faible coût, à l'aide de procédés continus dans des applications à grande échelle. Pour réaliser cette séparation, différentes techniques sont couramment utilisées :

- Les membranes de filtration ;
- La distillation ;
- L'extraction à l'aide de solvants ;
- Les résines échangeuses d'ions sont très employées pour la séparation de produits biologiques. De nombreuses études ont ainsi été menées à partir de cette technique afin de séparer tous les anions du milieu de culture à partir de différentes résines anioniques en éluant avec différentes solutions pour obtenir le meilleur rendement en acide lactique et la meilleure pureté [Evangelista et Nikolov, 1996 ; Ye et Jin, 1996 ; Cao *et al.*, 2000 ; Sosa *et al.*, 2001]. Gonzalez *et al.* [2006] ont eux proposé un processus sans ajout de réactif chimique et l'acide

lactique est obtenu directement en effluent dans le soluté avec une grande pureté. Il peut alors être concentré pour obtenir l'acide lactique de catégorie alimentaire commerciale.

- L'électrodialyse est un procédé de séparation par membrane utilisant un champ électrique pour déplacer des espèces ionisées en solution à travers des membranes denses, porteuses elles-mêmes de charges électriques. C'est la combinaison des propriétés des membranes et du transport électrophorétique qui permet d'en faire un procédé de déminéralisation ou de concentration d'espèces ioniques, ou encore un procédé de conversion électrochimique. Ainsi, cette technique permet à partir d'un sel de régénérer l'acide et la base correspondants. Dans une cellule à deux compartiments, le procédé produit classiquement la base pure côté de l'électrode cathodique, tandis qu'on obtient en sortie du compartiment anodique l'acide en mélange avec le sel non converti. Dans une cellule à trois compartiments, l'acide obtenu à l'anode est pur. Cependant, l'encrassement des membranes est un inconvénient important.

- L'estérification et l'hydrolyse [Figure 15] :

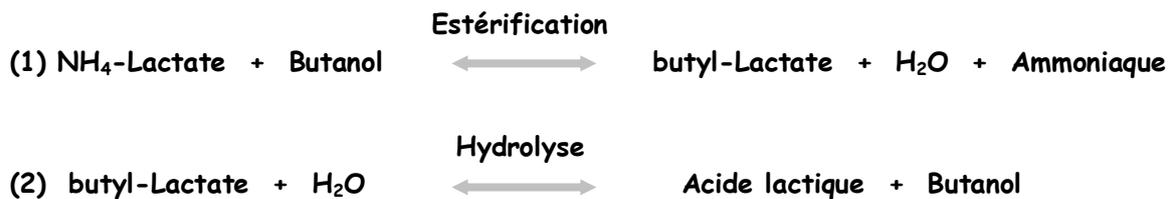


Figure 15 : réaction de purification de l'acide lactique par la méthode d'estérification et d'hydrolyse [Sun *et al.*, 2006].

Au vu de la sélectivité et de la réactivité favorables du lactate d'ammonium avec les composés sous forme alcool, l'estérification du lactate d'ammonium avec l'alcool approprié va donner l'ester correspondant, qui est beaucoup plus volatile que l'acide lactique lui-même. Sanz *et al.* [2004] ont utilisé le méthanol alors que Sun *et al.* [2006] ont eux choisi le butanol, l'éthanol peut aussi être utilisé. L'ester résultant de cette réaction va ensuite être récupéré par distillation, puis purifié dans un deuxième temps à l'aide d'une étape d'hydrolyse par l'eau et pour finir évaporé. Ce procédé de séparation permet d'obtenir un acide lactique d'une haute pureté, lequel est stable à la chaleur et dans l'eau, tout comme le produit synthétique. Ce protocole est une technique permettant d'extraire et de purifier l'acide lactique du bouillon de fermentation sans produire de sulfate de calcium comme sous-produit. De plus, l'alcool récupéré dans la réaction finale peut être réutilisé pour effectuer l'étape (1).

C. Le blé

Dans cette perspective d'avenir très prometteuse, le développement des processus de production d'acide lactique est en plein essor. Mais l'objectif principal des industriels est de produire de l'acide lactique à partir de lignocellulose plutôt que de sirop de betterave ou de canne à sucre ou encore de l'amidon de céréales. Une telle production basée sur la lignocellulose permettrait de produire un acide lactique qui serait compétitif avec ceux issus de matières fossiles et de valoriser ces matières premières peu coûteuses, abondantes, et qui pour le moment constituent le gros des déchets des industries produisant de l'éthanol par fermentation.

C.1. Le grain de blé

Le blé est une plante annuelle angiosperme et monocotylédone, elle fait partie de la famille des *Gramineae* et appartient au genre des *Triticum*. Les parois de la paille et du son de blé sont principalement constituées de cellulose, d'hémicelluloses, de lignines et dans une proportion plus faible d'acides hydroxycinnamiques, de protéines, de pectines et de silice.

Tableau 9 : La famille des *Gramineae*.

Famille	Sous-famille	Tribu	Sous-tribu	Genre	Nom commun (espèce)
<i>Gramineae</i>	<i>Festucoideae</i>	<i>Triticeae</i> <i>Aveneae</i>	<i>Triticineae</i>	<i>Triticum</i>	blé tendre
				<i>Secale</i>	blé dur
	<i>Panicoideae</i>	<i>Oryzeae</i> <i>Tripsaceae</i> <i>Andropogoneae</i>		<i>Hordeum</i>	seigle
				<i>Avena</i>	orge
				<i>Oryza</i>	avoine
				<i>Zea</i>	riz
				<i>Sorghum</i>	maïs
					sorgho

Le grain de blé est formé de trois parties et obtenu après battage, c'est-à-dire après élimination des balles enveloppant le grain [Feillet, 2000] :

- L'albumen (80 à 85% du grain) constitué de l'albumen amylicé (cellules remplies de granules d'amidon disséminés au milieu d'une matrice protéique et dont les parois celluloses sont peu visibles) et de la couche à aleurone ;

- les enveloppes de la graine ou sons (13 à 17%) ;
- le germe (3 %), à l'origine de la future plante.

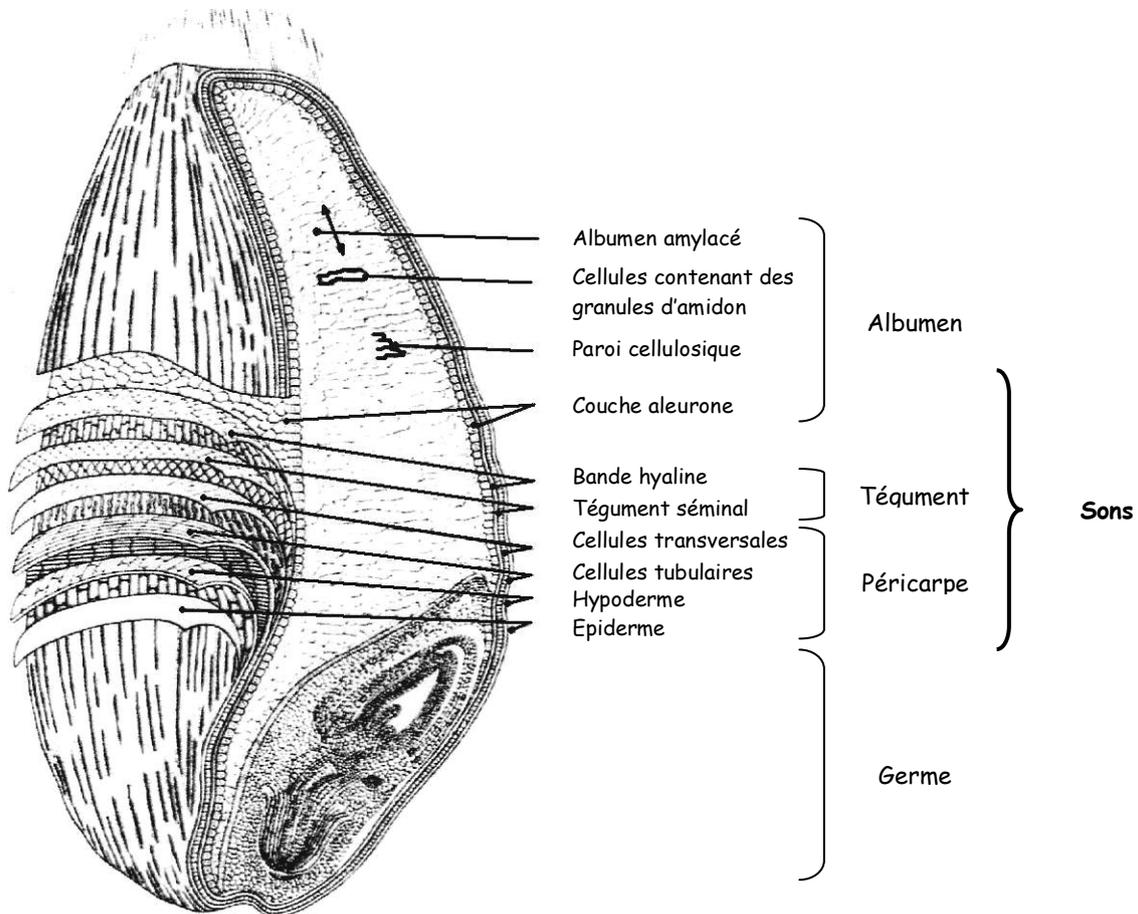


Figure 16 : Coupe longitudinale d'un grain de blé [Pomeranz, 1987].

C.2. Le son de blé

Le son de blé est composé de nombreux types cellulaires [Brillouet et Joseleau, 1987 ; Maes et Delcour, 2001] :

- Des téguments formés des cellules transversales et tubulaires, de l'hypoderme et de l'épiderme ;
- des couches plus internes que sont le tégument séminal, la bande hyaline et la couche d'aleurone.

Il est obtenu lors de la mouture du grain, ce procédé industriel de meunerie permet de séparer les différentes parties qui constituent la graine. Grâce à cette méthode, on va recueillir l'albumen amylicé (farine blanche), le germe et la fraction grossière (enveloppes).

Tableau 10 : Composition chimique des fractions de la paille de blé [Brillouet *et al.*, 1982].

Composés	Entre-nœuds	Nœuds	Feuilles
Lignines	21,6	21,7	26
Hémicelluloses :	24,6	30,9	25,8
arabinose	1,7	4,1	2,4
xylose	20,7	18,7	20,8
acide uronique	2,2	4,1	2,6
galactose	Tr.	2,3	Tr.
mannose	Tr.	1,7	Tr.
Cellulose	41,1	32,7	32,3
Protéines	3	4,5	4,8
Cendres	3,8	5,1	9,6
Silice	1,4	1,5	3,9

Tableau 11 : Composition chimique du son de blé [Brillouet et Joseleau, 1987].

Composés	Entre-nœuds
Lignines	3
Hémicelluloses :	19,4
arabinose*	1
xylose*	1,14
galactose*	0,03
mannose*	0,25
Acides uroniques	5,4
Amidon	29,4
Cellulose	7,2
Protéines	14,2
Cendres	4,3
Matières grasses	5,9

* : composition en monosaccharide est exprimée en rapport molaire, avec arabinose = 1

La composition de ce matériel hétérocellulaire complexe est très variable, en effet beaucoup de facteurs vont entrer en jeu tels que la variété et la maturité du blé, le procédé de meunerie, le mode de mouture de la farine, et selon le type de méthode analytique utilisé pour doser les différents constituants. Cependant, les structures majoritaires du son de blé, retrouvées dans tous les cas, sont les hémicelluloses, l'amidon (fraction résiduelle adhérente de l'albumen), les

protéines [Bergmans *et al.*, 1996] et la cellulose, retrouvée dans les microfibrilles formant une matrice incluse d'hémicelluloses et de lignines, qui constituent la paroi cellulaire des sons. Par contre, le son est très peu lignifié comparativement à la paille de blé [Tableaux 10 et 11].

C.2.1. L'amidon

L'amidon est la principale substance de réserve synthétisée et est localisé dans la graine. Il est composé de deux fractions polysaccharidiques qui sont des homopolymères composés d'unités glucopyranosyl : L'amylose et l'amylopectine [Myers *et al.*, 2000].

L'amylose représente la fraction minoritaire, environ 20 à 30% du poids du grain d'amidon, cependant ce pourcentage est très variable selon la plante voir même chez une même espèce telle que le maïs qui peut aller de 0 à 100%. Elle est essentiellement linéaire, avec moins de 1% de points de branchement (liaisons α -1,6 glucaniques). L'amylopectine, à l'opposé, est beaucoup plus ramifiée (entre 5 et 6%), et la longueur des chaînes α -1,4 glucaniques est variable selon les espèces, variant de 10 à 50 résidus glucose par chaîne.

Cependant, l'amidon contenu dans les sons est résiduel. Botaniquement parlant, la couche à aleurone fait partie de l'albumen, mais ne contient pas d'amidon contrairement aux cellules de réserves de l'albumen amylicé. Dans le son, il subsiste des parties plus ou moins importantes de cet albumen amylicé, et des vestiges des parois des cellules sub-aleuroniques, accolées aux parois périclinales des cellules aleurones. Dans l'albumen amylicé, l'amidon est distribué sous forme de granules plus ou moins grands qui sont en fait «déposés» en surface des cellules aleurones [Raynal-Ioualalen, 1996]. Le taux d'amidon résiduel retrouvé dans les sons va alors dépendre de différents facteurs comme l'espèce, le procédé de mouture, ou la présence ou non d'une étape de «brossage» des sons. Il en résulte une grande disparité du taux d'amidon résiduel des sons [Beaugrand, 2004].

C.2.2. La cellulose

La cellulose, le constituant principal de toutes les matières végétales, forme environ la moitié à un tiers de tissus végétaux et est constamment complétée par la photosynthèse [Lee, 1997]. Ceci représente une vaste matière de base potentielle pour un certain nombre

d'industries et a créé beaucoup d'intérêt de recherches [Sun *et al.*, 2005]. Elle joue un rôle dans la structure dans les parois cellulaires de protection des végétaux en particulier dans les tiges et les troncs et dans toutes les parties ligneuses des tissus végétaux [Salmén, 2004].

Chimiquement, la cellulose est un homopolymère linéaire formé d'unités de D-glucose liées les uns aux autres par des liaisons 1 → 4 en configuration β-glycosidiques [Sun *et al.*, 2004] et sa longueur de chaînes peut atteindre les 4 000 à 8 000 unités [Aristidou et Penttilä, 2000].

C.2.3. La lignine

La lignine est la deuxième matière organique renouvelable abondante sur Terre, juste après la cellulose, qu'elle accompagne dans le bois, la paille et d'autres tissus végétaux [Rohella *et al.*, 1996].

Les teneurs en lignines des parois varient en fonction de l'espèce, de l'organe, du tissu et de l'âge de la plante. Dans les tissus rigides, les lignines représentent 10 à 25% de la matière sèche [Sarkanen *et al.*, 1971]. Elles jouent un rôle fondamental dans le soutien mécanique et l'imperméabilisation des tissus de soutien et des tissus conducteurs. Elles forment une barrière physique empêchant la pénétration des agents pathogènes.

La structure chimique de la lignine est un biopolymère aromatique qui est essentiellement formé d'unités substituées de phenyl-propane qui sont liées ensemble pour former un polymère manquant de régularité, de cristallinité, ou d'activité optique. Son ossature principale est constitué d'interunités de type aryle-aryle éther. De plus, la lignine semble être en particulier associée aux polysaccharides hémicellulosiques. En raison de sa réticulation, la lignine est habituellement insoluble dans tous les dissolvants, à moins qu'elle ne soit dégradée par des traitements physiques ou chimiques [Sun *et al.*, 2000].

C.2.4. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses représentent environ 20-35% de la biomasse lignocellulosique et son degré de polymérisation est relativement faible [Hamelinck *et al.*, 2005 ; Palmqvist et Hahn-Hägerdal, 2000]. Les hétéroxylanes sont les hémicelluloses les plus

abondantes [Saha *et al.*, 2003] et peuvent constituer plus de 30% de la matière sèche des parois végétales [Joseleau *et al.*, 2002]. À la différence de la cellulose, les hémicelluloses ne sont pas chimiquement homogènes. Ce sont des polymères hétérogènes constitués de pentoses (xylose, arabinose), d'hexoses (mannose, glucose, galactose), et d'acides de sucre [Sun *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2002 ; Sun et Hughes, 1998].

Les hémicelluloses de bois dur (angiospermes) contiennent la plupart du temps des xylanes, tandis que les hémicelluloses de bois tendre (gymnospermes) contiennent la plupart du temps des glucomannanes. Elles forment un groupe hétérogène étroitement associé à la cellulose par des liaisons non covalentes, et/ou aux lignines par des liaisons covalentes.

Les xylanes de beaucoup de matières végétales sont des hétéropolysaccharides avec des chaînes homopolymériques ayant comme structure principale des résidus β -D-xylopyranose lié en 1,4. Seuls 37% des résidus de xylose de cette chaîne ne sont pas substitués [Shiiba *et al.*, 1993]. Le xylose peut être substitué par différents résidus en O-2 et/ou O-3 :

- des résidus d'arabinose liés en α -1,2 et/ou α -1,3, présents en simple unité ou en courtes chaînes ;
- de l'acide glucuronique ou son dérivé éther 4-O-méthylé lié en α -1,2, présents en simple unité ;
- ainsi que des acides acétiques, féruliques, galacturoniques et coumariques.

La fréquence, la longueur et la composition des hémicelluloses dépendent de la source du xylane [Bataillon, 1998]. Des xylanes peuvent être classés par catégorie ainsi en tant qu'homoxylane, arabino-xylane linéaire, glucurono-xylane, et glucurono-arabino-xylane [Saha, 2003].

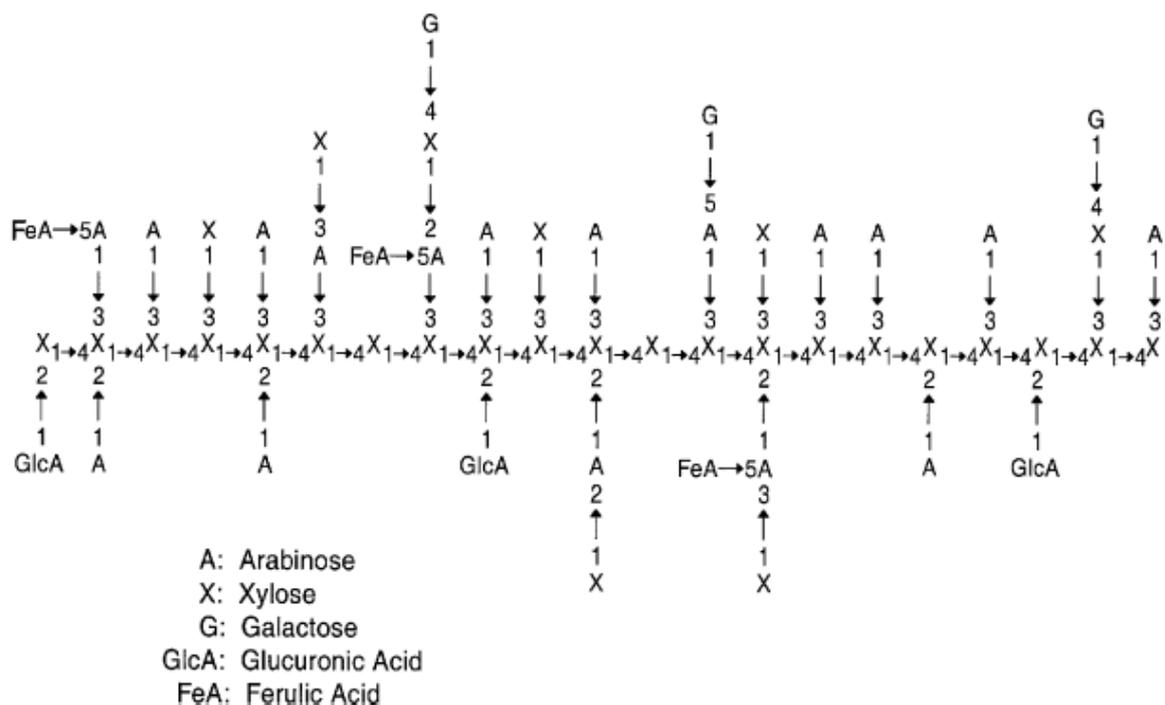


Figure 17 : Structure schématique des hémicelluloses du blé [Saulnier *et al.*, 1995].

C.3. Les co-produits du blé

Le blé est à la base du régime alimentaire de l'Europe, de l'Amérique du Nord, de l'Afrique du Nord et d'une partie de l'Asie. La production mondiale de blé est de 623,7 millions de tonnes [source Blé contact - AGPB 174, 2005], soit 30% environ de la production mondiale de céréales. La France est le premier pays producteur de blé dans l'Union européenne et le cinquième au niveau mondial après la Chine, l'Inde, les États-Unis et la Communauté des états indépendants [FAO, 2005]. En 2005, la production de blé en France était de 39,4 millions de tonnes [source Blé contact - AGPB 175, 2005], soit 54% de la production française en céréales.

Cette production de blé se retrouve principalement dans la moitié nord de la France [Figure 18].

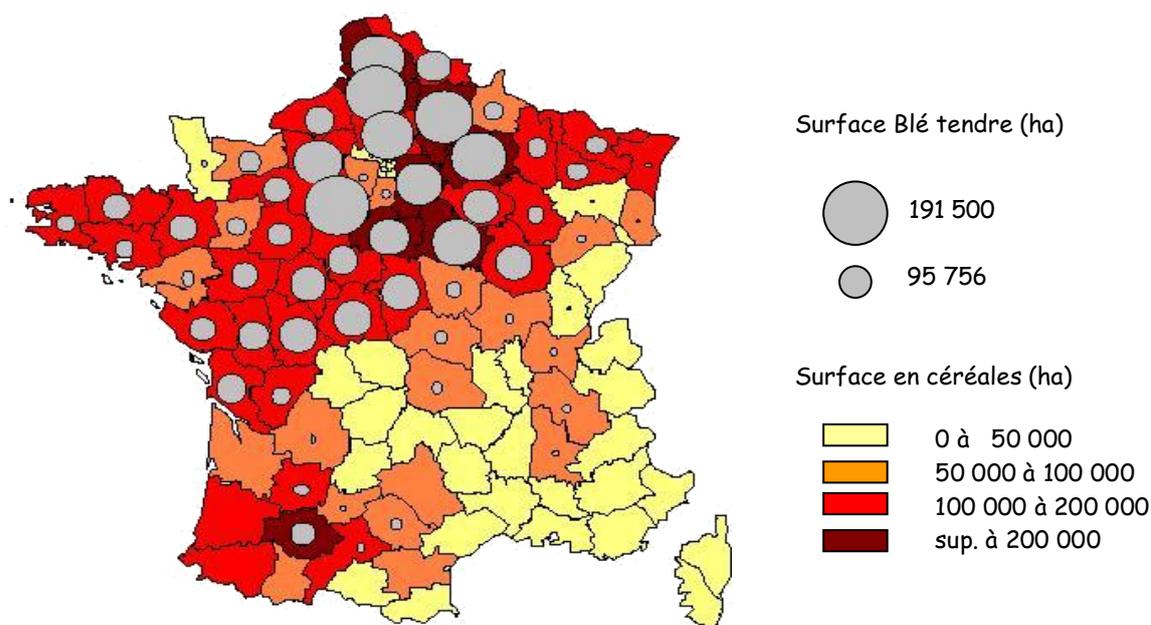


Figure 18 : Carte des surfaces en céréales et en blé tendre en France.

Différentes espèces commerciales de blé sont cultivées. Le blé tendre sert essentiellement à la boulangerie, la glutennerie et la biscuiterie-pâtisserie. Le blé dur est employé pour la fabrication du couscous et des pâtes alimentaires. La France produit essentiellement du blé tendre, ce qui correspond à 95% de la production [Figure, ci-dessous].

Céréales	Quantité (10 ⁶ t)	%
Blé tendre	33,8	53,2
Blé dur	1,5	2,4
Orge	2,8	15,1
Avoine	0,5	0,8
Seigle	0,2	0,3
Sorgho	0,4	0,6
triticale	1,2	1,9
Maïs	16,1	25,4
Total	63,5	100

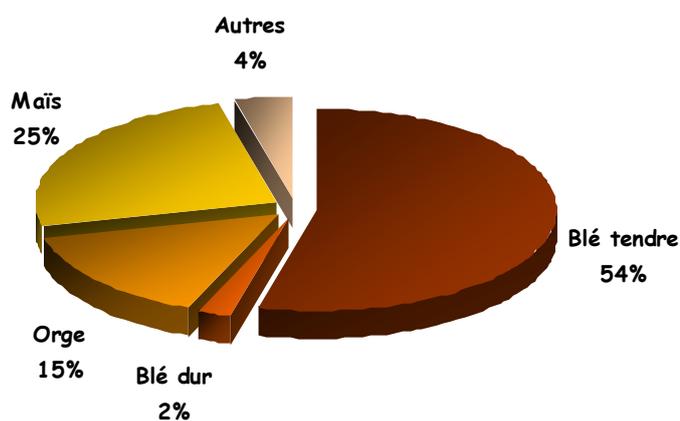


Figure 19 : Le blé parmi les céréales en France de 1999 à 2001.

La première étape de transformation du blé en grain concerne la meunerie et permet de séparer 3 composés : le son, les germes et les farines qui représentent la principale valorisation

industrielle du blé en raison de leur forte teneur en amidon. En effet, le rendement en amidon obtenu en amidonnerie selon le procédé classique est d'environ 60% [Figure 20].

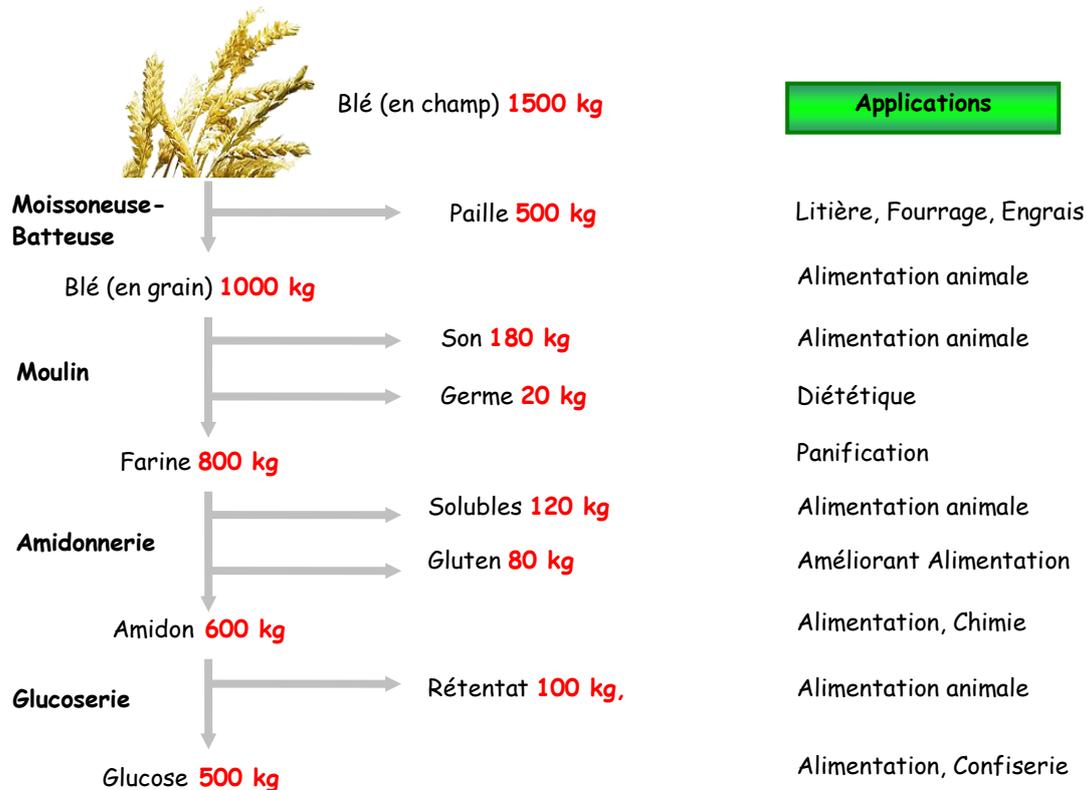


Figure 20 : Fractionnement du blé et applications des différents produits obtenus en France.

Ainsi chaque année, c'est environ 100 millions de tonnes de son qui sont produits dans le monde et ceci représente des quantités considérables. Néanmoins leurs voies de valorisations sont encore peu développées. Actuellement, le principal débouché est l'alimentation animale, mais les pentoses contenus dans le son sont retrouvés dans les excréments, car non utilisables par les animaux. Ensuite, une petite partie est utilisée en tant qu'ingrédient de base dans les fibres alimentaires. Cependant, ces débouchés du son de blé représentent une faible valeur ajoutée, d'où l'intérêt de trouver des voies de valorisations aux pentoses contenus dans ce co-produit.

C.4. Hydrolyse des résidus hémicellulosiques

Les éléments déterminants pour pouvoir produire de l'acide lactique sur une base de sirop de sucres en C5 sont les suivants :

- produire un substrat ayant un prix de revient proche de celui des sucres en C6 ;
- produire un sirop de sucre en C5 permettant un développement d'une biomasse importante et d'une fermentation lactique non inhibée (absence de toxiques dans le substrat de départ).

C.4.1. Hydrolyse chimique et physique

Tableau 12 : Méthode de pré-traitement de la biomasse lignocellulosique [Saha et Bothast, 1997]

Méthodes	Exemples
Thermo-Mécanique	Meulage, fraisage, cisaillement, extrusion
Auto-hydrolyse	Explosion à la vapeur, pression, explosion au dioxyde de carbone
Traitement acide	Acide dilué et concentré (HCl, H ₂ SO ₄)
Traitement alcalin	Soude, ammoniacque, peroxyde d'hydrogène alcalin
Solvants organiques	Méthanol, éthanol, butanol, phénol

Le pré-traitement de la biomasse lignocellulosique est crucial avant l'hydrolyse enzymatique. Les diverses options de traitement préparatoire sont disponibles maintenant pour fractionner, solubiliser, hydrolyser et séparer la cellulose, l'hémicellulose, et les composants de lignine. Dans chaque option, la biomasse est réduite en taille et sa structure physique est ouverte.

Deux catégories des prétraitements d'acide dilué sont employées : à débit continu et à haute température (160 °C) pour une concentration de 5-10% (p/p) et basse température (< 160 °C) traitement par lots pour une concentration de 10-40% (p/p). Le traitement préparatoire d'acide dilué à température élevée hydrolyse habituellement l'hémicellulose en sucres simples (xylose, arabinose et d'autres sucres), qui sont hydrosolubles. Le résidu contient la cellulose et souvent une grande partie de la lignine qui peuvent être extraites au moyen de dissolvants tels que butanol, ou l'acide formique.

L'utilisation du SO_2 à 1% (p/p) comme catalyseur pendant le traitement préparatoire à la vapeur (à 200-210 °C) a comme conséquence l'accessibilité enzymatique de la cellulose et l'augmentation des sucres dérivés d'hémicellulose. Par explosion à la vapeur, la solubilisation optimale, et la dégradation de l'hémicellulose peuvent généralement être réalisées par un temps de séjour à haute température et court (270 °C, 1 min) ou à plus basse température et un plus long temps de séjour (190 °C, 10 min).

L'explosion au dioxyde de carbone serait plus efficace pour le prétraitement des matériaux cellulosiques avant l'hydrolyse enzymatique. [Zheng et al. \[1998\]](#) ont comparé ce procédé à l'explosion de vapeur ou à l'ammoniac pour le traitement préparatoire de la bagasse de canne à sucre. Ils ont constaté que l'explosion au CO_2 était plus rentable que l'explosion à l'ammoniac et n'a pas causé la formation des composés inhibiteurs, qui pourraient se produire dans l'explosion de vapeur.

[Cao et al. \[1996\]](#) ont rapporté une méthode de prétraitement qui implique le trempage de la biomasse lignocellulosique (employant l'épi de maïs comme matière de base modèle) dans NH_4OH dilué à température ambiante pour enlever la lignine, l'acétate, et les extractifs. Ceci est suivi d'un traitement à l'acide dilué qui hydrolyse aisément la fraction d'hémicellulose en sucres simples, principalement xylose. La fraction résiduelle de cellulose de la biomasse peut alors être enzymatiquement hydrolysée en glucose.

[Garrote et al. \[2001\]](#) ont traité les substrats de bois d'eucalyptus avec de l'eau dans des conditions de fonctionnement choisies (réaction d'autohydrolyse) pour obtenir une phase liquide contenant les produits de décomposition d'hémicellulose (principalement xylooligosaccharides acétylés, xylose, et acide acétique). Ensuite dans une étape acide-catalysée (réaction de post-hydrolyse), des xylooligosaccharides ont été convertis en xylose. La méthode d'oxydation humide peut être employée pour le fractionnement lignocellulosique de la fraction d'hémicellulose solubilisée et de la fraction pleine de cellulose.

[Bjerre et al. \[1996\]](#) ont constaté qu'une combinaison d'hydrolyse alcaline et d'oxydation humide n'a pas produit de furfural et de furfural 5-hydroxyméthyl. [Klinke et al. \[2002\]](#) ont caractérisé les produits de dégradation de l'oxydation humide alcaline (l'eau, carbonate de sodium, oxygène, haute température, et pression) de la paille de blé. Indépendamment du CO_2 et de l'eau, les

acides carboxyliques étaient les produits principaux de dégradation de l'hémicellulose et de la lignine.

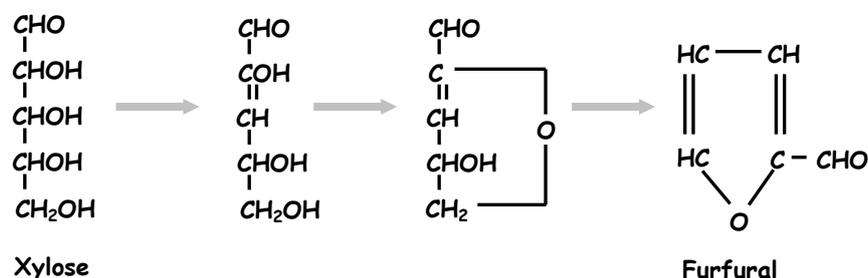


Figure 21 : Transformation du xylose en furfural au cours du procédé d'hydrolyse acide à chaud de polymère d'arabinoxylanes.

Au cours du pré-traitement de la biomasse lignocellulosique, l'apparition de toxiques, qui sont considérés comme des inhibiteurs, est un verrou technologique pour les procédés utilisant les micro-organismes [Persson *et al.*, 2002 ; Luo *et al.*, 2002]. Ces toxiques, des composés phénoliques de la dégradation de lignine, des acides aliphatiques (acide acétique, acide formique et acide lévulinique) et notamment le furfural produit au cours du procédé chimique d'hydrolyse des arabino-xylosanes, nécessitent une étape annexe de détoxification ce qui génère un coût supplémentaire dans le cadre d'un procédé par voie chimique standard [Delgenes *et al.*, 1996 ; Dias *et al.*, 2005 ; Sreenath et Jeffries, 2000].

Diverses méthodes pour la détoxification des hydrolysats ont été développées. Celles-ci incluent le traitement avec des résines d'échange ionique, le charbon de bois, pré-fermentation avec le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*, déplacement des composés non-volatiles, extraction avec de l'éther ou l'acétate éthylique, et traitement avec de la chaux ou le sulfite. Chaque méthode de prétraitement offre des avantages et des inconvénients distincts [Saha, 2003].

Ainsi, un procédé minimisant voire ne produisant pas de furfural et autres toxiques doit être privilégié en raison des contraintes techniques que génère la présence de ces molécules. Une approche enzymatique de l'hydrolyse peut constituer une solution technique à ce problème.

C.4.2. Hydrolyse enzymatique

La dégradation de l'hémicellulose impose plusieurs défis intrinsèques pour le microorganisme. Le polymère présente un poids moléculaire important, est en général insoluble ou associé à la cellulose et à la lignine. L'hémicellulose est également fortement variable dans sa structure, et bien que le nombre réel de différentes liaisons chimiques soit limité, elles peuvent être présentées dans différents environnements structuraux. La dégradation efficace du polymère exige l'action concertée de nombreuses enzymes qui doivent fonctionner synergiquement [Figure 22]. Pendant que l'hydrolyse des polysaccharides a lieu en dehors de la cellule, les microorganismes doivent s'assurer qu'au moins une partie des sucres solubles résultants sera disponible pour eux.

Récemment, le progrès le plus significatif dans le domaine des hemicellulases est venu de la détermination de plus en plus importante des structures à haute résolution des domaines catalytiques et non-catalytiques. Ceux-ci, ainsi que des études biochimiques et thermodynamiques sophistiquées, ont augmenté énormément la compréhension du rapport structure/fonction de ces enzymes. De plus, le nombre croissant de nouveaux genres microbiens devrait permettre de découvrir de nouveaux systèmes hémicellulolytiques. Par conséquent, certains des défis restants dans ce domaine incluent la conception des systèmes enzymatiques efficaces pour une dégradation économique de la paroi des végétaux, l'élucidation des mécanismes de normalisation et la conception de nouvelles fonctionnalités d'enzymes par l'intermédiaire de la technologie protéique.

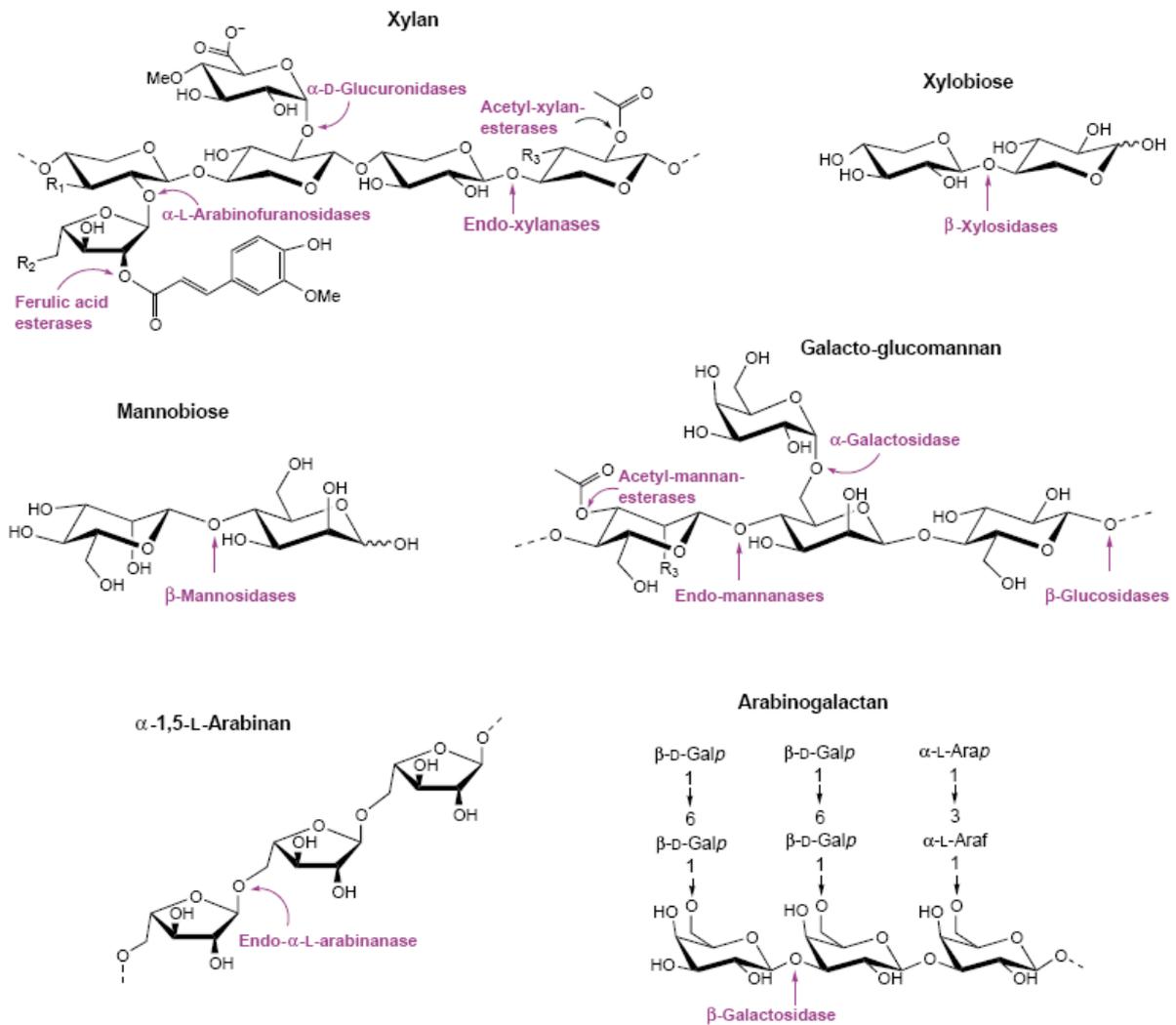


Figure 22 : Présentation des différentes hémicelluloses [Shalom and Shoham, 2003].

C.4.3. Procédé réalisé chez A.R.D. [Communication personnelle, Martel, F.]

La fabrication de l'hydrolysat de son suit le procédé illustré sur la Figure 23.

La première étape de traitement du son s'effectue à l'aide d'une presse à vis. L'extraction par pression permet de séparer les liquides des solides en leur appliquant une pression extérieure [Bimbenet *et al.*, 2002]. La presse à vis est une presse continue conçue pour traiter des débits importants. La pression croît de l'entrée vers la sortie. La presse à vis permet de séparer le marc de son du jus d'acide phytique, mais aussi d'éliminer les composés sensibles à l'hydrolyse comme l'amidon. L'acide phytique est ensuite commercialisé pour son pouvoir chélatant sur une large gamme de pH (à l'inverse de l'EDTA).

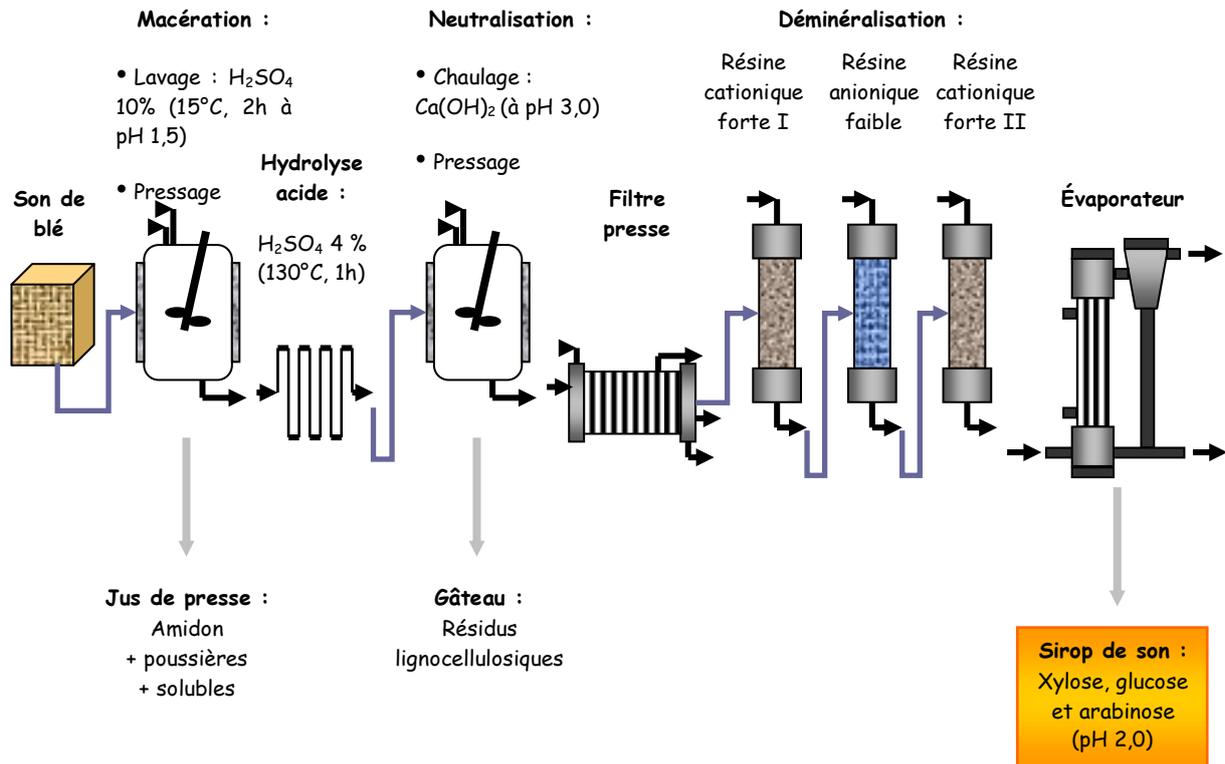


Figure 23 : Procédé d'extraction des pentoses du son de blé mis en œuvre chez A.R.D.

La deuxième étape est une hydrolyse acide en continu et à chaud. Celle-ci est réalisée dans un long tube en épingle appelé lyre, pourvue d'un système de chauffage par injection directe de vapeur (Jet-Cooker). L'utilisation de la lyre pendant une heure à 130 °C permet d'hydrolyser la liaison osidique entre les sucres pour n'obtenir que des monomères [Roller, 1999]. Antérieurement, l'hydrolyse acide se faisait après extraction des hémicelluloses par voie alcaline, mais les rendements en pentoses sont bien supérieurs par hydrolyse acide directe du son [Qiabi *et al.*, 1994 ; Torget *et al.*, 1996].

Enfin, les phases liquides et solides sont séparées grâce à un filtre-presse. C'est une machine constituée de plusieurs filtres juxtaposés de manière étanche et qui définissent entre eux des chambres où arrive la suspension et se forment les gâteaux. Ce sont les filtres qui développent la surface filtrante la plus importante pour l'encombrement le plus faible. Le filtre-presse utilisé au pilote est à plateaux et à cadres. Les plateaux supportent les plaques filtrantes. Les cadres sont des plateaux évidés de manière à recevoir le solide, tandis que les plaques assurent le drainage du filtrat vers la sortie.

Auparavant, un chaulage est nécessaire afin de faciliter l'étape de séparation et de précipiter les impuretés telles que l'acide sulfurique qui se retrouve sous forme de sels calciques. Le jus obtenu est appelé jus de filtre-presse.

Le procédé classique utilisé par A.R.D. afin de purifier les sucres passe par une déminéralisation. En effet, l'addition d'acide sulfurique et le chaulage au cours de la transformation du son rendent les jus de filtre-presse riches en ions sulfate et calcium. Cette déminéralisation s'effectue grâce à différentes résines d'échange d'ions représentées sur le schéma ci-contre :

- Une résine cationique forte (CF I) qui a pour but de fixer les cations comme les ions calcium incorporés lors du chaulage, mais aussi des colorants et des protéines.
- Une résine anionique faible (Af) permettant de retenir les acides organiques et les anions minéraux, surtout les ions sulfate issus de l'hydrolyse du son de blé.
- Une résine cationique forte (CF II) qui consiste à affiner le sirop et le reconfigurer en pH acide (puisque les impuretés ont été échangées précédemment avec des ions OH). Ceci a pour effet de faciliter sa conservation ainsi que la glycosylation des sucres lors de la synthèse des tensioactifs (qui s'effectue en catalyse acide).

Cette étape de déminéralisation a déjà fait l'objet de nombreuses recherches afin d'optimiser la purification en elle-même ainsi que les débits. Cependant, elle reste la plus coûteuse du procédé, car elle génère de gros volumes d'éluats qu'il faut retraiter et consomme beaucoup de régénérants et de décontaminants.

L'étape ultime d'obtention du sirop de son est une concentration des jus déminéralisés en vue d'obtenir des sirops compris entre 70 et 75% de MS. La concentration a lieu dans un évaporateur à flot tombant.

D. Les isomérases

D.1. Présentation et Définitions des isomérases

D.1.1. La D-xylose isomérase

La xylose isomérase (D-xylose ketol isomérase E.C. 5.3.1.5), généralement désignée sous le nom de glucose isomérase (GI), est une enzyme intracellulaire qui catalyse l'isomérisation réversible du D-xylose en D-xylulose, qui est alors retrouvé dans la voie des pentoses phosphate ou la voie du phosphoketolase, mais également du D-glucose en D-fructose [Belfaquih et Penninckx, 2000]. La conversion du xylose en xylulose sert aux bactéries saprophytiques qui prospèrent de la matière végétale se délabrant et facilite également la bioconversion de l'hémicellulose en éthanol.

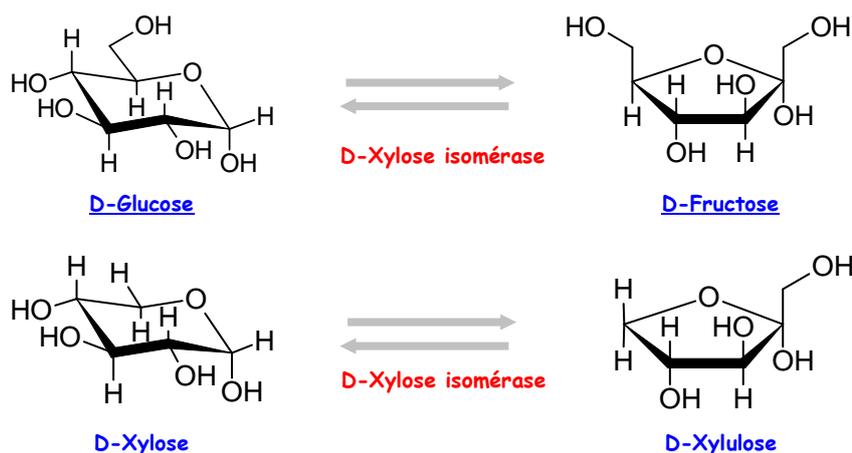


Figure 24 : Réaction de conversion de la xylose isomérase.

Les xylose isomérases sont séparées en deux classes selon leur homologie de séquence [Hess et al., 1998]. La classe I des XIs regroupe les souches du genre *Ampullariella*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Thermus* et de l'espèce *Actinoplanes missouriensis*. La classe II des XIs comprend les souches des espèces *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et du genre *Thermotoga*. Ces deux classes sont distinctes selon la région N-terminale [Chang et al., 1999].

D.1.2. La L-arabinose isomérase

La L-arabinose isomérase (AI, EC 5.3.1.4) convertit l'aldo-pentose, L-arabinose en cétose, le L-ribulose, mais elle a également la capacité d'isomériser le D-galactose en D-tagatose [Lee *et al.*, 2005].

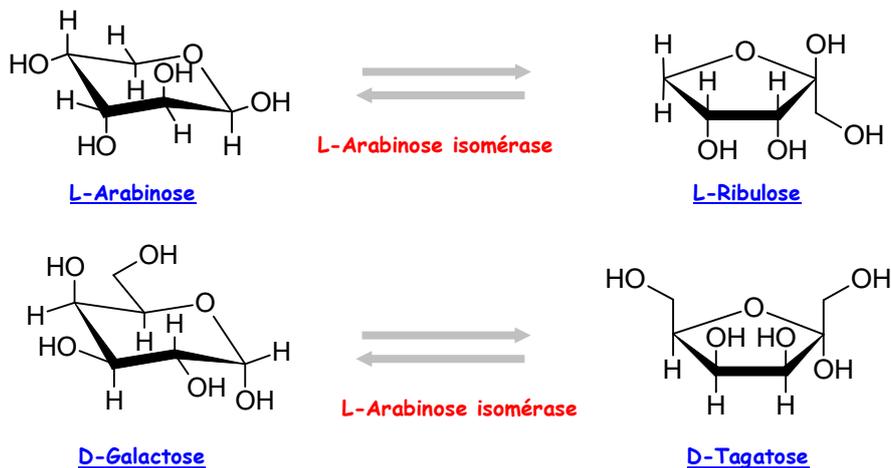


Figure 25 : Réaction de conversion de l'arabinose isomérase [Lee *et al.*, 2004].

D.2. Principaux micro-organismes producteurs ou répartition

La L-arabinose isomérase et la xylose isomérase sont largement distribuées chez les procaryotes [Tableau 13-14].

Pour la xylose isomérase, après sa découverte dans la souche *Pseudomonas hydrophila*, un grand nombre de bactéries dont de nombreux *Actinomycètes* se sont avérés produire cette enzyme. Parmi ces microorganismes on trouve les bactéries hétérolactiques, avec *Lactobacillus brevis* qui a le rendement le plus élevé de l'enzyme. Aussi bien que les espèces de *Streptomyces*, plusieurs espèces de *Bacillus* sont de bons producteurs de xylose isomérase. Majoritairement, la xylose isomérase est intracellulaire, mais elle est extracellulaire chez les espèces *Chainia* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces glaucescens* et *Streptomyces flavogriseus*, pour ces deux derniers la libération de l'enzyme des cellules a été attribuée à un changement de perméabilité de la membrane cellulaire et à une lyse partielle des cellules. Elle a été également décrite chez quelques levures telles que *Candida boidinii* et *Candida utilis* et chez les mycètes *Pyromyces* et *Malbranchea*. [Bhosale *et al.*, 1996].

Tableau 13 : Distribution de quelques xylose isomérases chez les bactéries, les levures et les champignons.

Organismes	T°C de croissance	Localisation	Références
Bactéries			
<i>Actinoplanes missouriensis</i>			Van Tillbeurgh <i>et al.</i> , 1992
<i>Arthrobacter sp.</i>			Sapunova <i>et al.</i> , 2003
<i>Arthrobacter N.R.R.L. B3728</i>			Smith <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus sp</i>		extracellulaire	Chauthaiwale <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus licheniformis</i>	37		Scheler <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus KX-6</i>			Kwon <i>et al.</i> , 1987
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	37	intracellulaire	Kawai <i>et al.</i> , 1994
<i>Chainia spp</i>		extracellulaire	Vartak, 1984
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>			Meaden <i>et al.</i> , 1994
<i>Clostridium thermosulfurigenes</i>			Lee <i>et al.</i> , 1990
<i>Escherichia coli</i>	30	intracellulaire	Schellenberg <i>et al.</i> , 1984
<i>klebsiella pneumoniae</i>			Feldmann <i>et al.</i> , 1992
<i>Lactobacillus brevis</i>			Yamanaka, 1968
<i>Lactobacillus xylosus</i>			Yamanaka et Takahara, 1977
<i>Lactobacillus pentosus</i>			Lokman <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas hydrophila</i>			Marshall et kooi, 1957
<i>Streptomyces rubiginosus</i>			Carell <i>et al.</i> , 1984
<i>Streptomyces murinus</i>			Skoet et Guertler, 1987
<i>Streptomyces coelicolor</i>	30	intracellulaire	Hafner et Jackson, 1985
<i>Streptomyces chibaensis</i>			Joo <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces violaceus-ruber</i>			Callens <i>et al.</i> , 1986
<i>Streptomyces diastaticus</i>			Liao <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces glaucescens</i>		extracellulaire	Weber, 1976
<i>Streptomyces flavogriseus</i>		extracellulaire	Chen <i>et al.</i> , 1979
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>			Meng <i>et al.</i> , 1993
<i>Thermotoga neapolitana</i>			Vieille <i>et al.</i> , 1995
<i>Thermotoga maritima</i>			Brown <i>et al.</i> , 1993
<i>Thermus aquaticus</i>			Lehmacher et Bisswanger, 1990
Levures			
<i>Candida boidinii</i>			Vongsuvanlert et Tani, 1988
<i>Candida utilis</i>			Tomoyeda et Horitsu, 1964
Moisissures			
<i>Malbranchea pulchella</i>			Banerjee <i>et al.</i> , 1994
<i>Pyromyces sp. A.T.C.C. 76762</i>			Kuyper <i>et al.</i> , 2003

L'enzyme a été isolée à partir de beaucoup de micro-organismes et les gènes des espèces d'*Escherichia coli*, de *Bacillus subtilis*, de *Clostridium*, des espèces de *Streptomyces*, des espèces d'*Ampullariella* et de la souche *Actinoplanes missouriensis* ont été décrits, clonés et séquencés [Lee *et al.*, 2005].

En ce qui concerne l'arabinose isomérase, elle a été décrite principalement chez les bactéries du genre *Bacillus*, les bactéries hétérolactiques du genre *Lactobacillus* et les bactéries thermophiles du genre *Thermotoga*.

Tableau 14 : Distribution de quelques arabinose isomérases chez les bactéries [Jørgensen *et al.*, 2004].

Organismes	T°C de croissance	Localisation	Références
<i>Aerobacter aerogenes</i>	30	intracellulaire	Yamanaka et Wood, 1966
<i>Bacillus halodurans</i>	37		Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	37		Sa-Nogueira <i>et al.</i> , 1997
<i>Escherichia coli</i>	37		Patrick et Lee, 1968
<i>Flavobacterium hibernum</i>	25		McCammon <i>et al.</i> , 1998
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	55		Lee <i>et al.</i> , 2005
<i>Lactobacillus gayonii</i>	30		Nakamatu et Yamanaka, 1969
<i>Lactobacillus pentosus</i>	30		Ibrahim et Spradlin, 2001
<i>Lactobacillus plantarum</i>	30		Heath <i>et al.</i> , 1958
<i>Mycobacterium smegmatis</i>			Izumori <i>et al.</i> , 1978
<i>Thermoanaerobacter mathranii</i>	65		Sonne-Hansen <i>et al.</i> , 1993
<i>Thermotoga maritima</i>	80	intracellulaire	Lee <i>et al.</i> , 2004
<i>Thermotoga neapolitana</i>	80		Kim <i>et al.</i> , 2002

D.3. Différence entre la voie d'utilisation des pentoses procaryote et eucaryote

Les levures et les bactéries ont la capacité d'utiliser le xylose ou l'arabinose pour certaines d'entre-elles, mais elles vont utiliser des voies légèrement différentes pour la conversion de ces deux pentoses en xylulose-5-phosphate, qui est le précurseur de la voie des pentoses-phosphates.

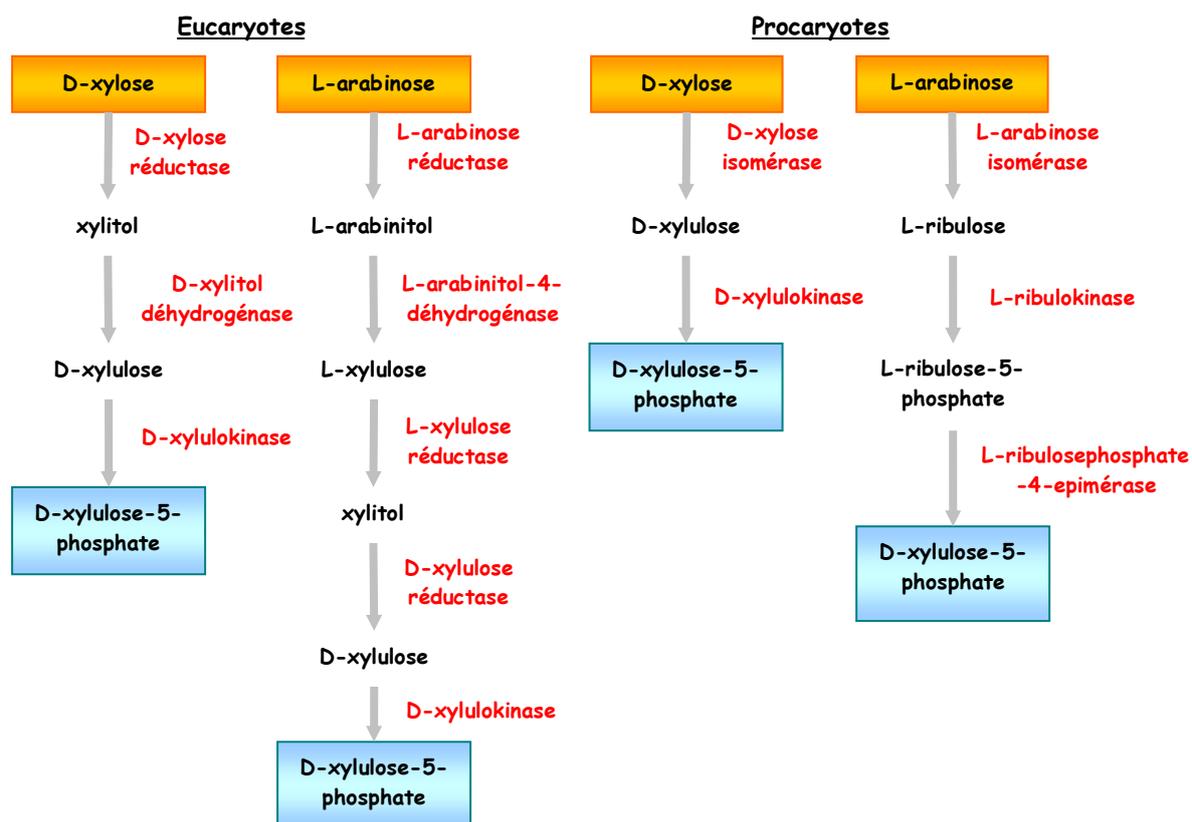


Figure 26 : Voies d'utilisation du xylose et de l'arabinose chez les eucaryotes et les procaryotes [Richard *et al.*, 2003].

Tout d'abord, la première voie métabolisant le xylose en xylulose par la xylose isomérase est typique des bactéries. Contrairement à celles-ci, les levures, munies de la D-xylose réductase et de la D-xylitol déshydrogénase, produisent du xylulose à partir du xylose en passant par une étape intermédiaire : le xylitol. Le xylulose est ensuite phosphorylé par la D-xylulokinase en xylulose-5-P qui peut être utilisé par la voie des pentoses phosphate. Celle-ci va ensuite rejoindre la voie Entner-Doudoroff conduisant à la formation d'éthanol [Jackson et Nicolson, 2002]. En ce qui concerne l'arabinose, il en est de même, la voie de transformation en xylulose-5-phosphate est réalisée en cinq étapes par les levures. Les intermédiaires retrouvés lors de ces étapes sont dans l'ordre : L-arabinitol, L-xylulose, xylitol et D-xylulose. Alors que chez les bactéries, ceci est réalisé en trois étapes.

D.4. Purification

De nombreuses xylose isomérases ont déjà été purifiées, ainsi que des arabinose isomérases. Quelques exemples de schémas de purification suivis pour ces enzymes sont donnés dans les Tableaux ci-dessous.

Tableau 15 : Exemples de quelques purifications de xylose isomérase bactériennes.

Souches	1ère étape	2ème étape	3ème étape	4ème étape	5ème étape	Références
<i>Bacillus KX-6</i>	Sulfate d'ammonium	DEAE-Sepharose Ion Exchange	G-200 gel filtration			Kwon <i>et al.</i> , 1987
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Sulfate d'ammonium	DEAE-Cellulose	1st Butyl-Toyopearl	2nd Butyl-Toyopearl		Kawai <i>et al.</i> , 1994
<i>Lactobacillus xylosus</i>	Sulfate d'ammonium	Sephadex G-200				Yamanaka et Takahara, 1977
<i>Streptomyces chibaensis</i>	Sulfate d'ammonium	DEAE-Cellulose	S-300 gel filtration			Joo <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Sulfate d'ammonium	Sephadex G-150	DEAE-Cellulose	Sephacryl 200		Hafner et Jackson, 1985
<i>Bacillus licheniformis</i>	Heat treatment	DEAE-Sepharose Fast Flow	Sephacryl S-300			Scheler <i>et al.</i> , 1991
<i>Streptomyces sp. NCIM 2730</i>	Sulfate d'ammonium	DEAE-Cellulose				Borgi <i>et al.</i> , 2004
<i>Alcaligenes ruhlandii</i>	DEAE-cellulose	Sulfate d'ammonium	Sephacryl S200			Moneke <i>et al.</i> , 1998
<i>Paenibacillus sp.</i>	DEAE-cellulose	Sulfate d'ammonium	Sephacryl S200			
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	Heat treatment	Q-Sepharose Fast Flow	Sephacryl S200	Phenyl-Sepharose	FPLC on Mono Q HR/5/5 column	Lama <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermanaerobacterium sp</i>	Sulfate d'ammonium	FPLC	DEAE-Sepharose	Phenyl-Sepharose	Superose-12	Liu <i>et al.</i> , 1996

Ces enzymes ont été purifiées en suivant les procédures usuelles. Après centrifugation et cassage des cellules, le surnageant est généralement concentré par précipitation au sulfate d'ammonium, ou par traitement à chaud. Plus rarement, ce surnageant va directement être appliqué sur une colonne de chromatographie. La suite de la purification est effectuée en combinant différentes techniques de chromatographie : échange d'ions, exclusions.

D.5. Propriétés

Tableau 16 : Quelques propriétés de xylose isomérase bactériennes.

Souches	pH opt	Stabilité au pH	T °C opt	Thermo-stabilité	Masse molaire (Da)	pI	Inhibiteur	Activateur	Substrats	Références
<i>Bacillus KX-6</i>		7,0 - 10,0			120 000 (homo-tetramère)		Hg ²⁺ , Ag ²⁺ , Cu ²⁺	Co ²⁺	xylose, ribose, glucose, arabinose	Kwon <i>et al.</i> , 1987
<i>Bifidobacterium adlescentis</i>	7,0	6,0-9,0, 70%, 60 °C	60	50%, 64 °C, 10 min	168 000 (homo-tetramère)	4,3	Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺		xylose	Kawai <i>et al.</i> , 1994
<i>Streptomyces chibaensis</i>	7,5		85	50%, 90 °C, 126 min	180 000 (homo-tetramère)		Hg ²⁺ , Ag ²⁺ , Cu ²⁺	Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺		Joo <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces coelicolor</i>	7,0		70		160 000 (homo-tetramère)		Hg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , xylitol	Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺		Sailaja et Richard, 1993
<i>Bacillus licheniformis</i>	7,2	6,8-7,6, 80%, 70 °C	70	50%, 67 °C, 70 min	200 000 (homo-tetramère)			Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺	xylose, glucose	Vieille <i>et al.</i> , 2001
<i>Alcaligenes ruhlantii</i>	7,0		60-65	50%, 55 °C, 6jrs	199 000 (homo-tetramère)		Cu ²⁺ , xylitol	Mg ²⁺ , Co ²⁺	xylose, glucose	Moneke <i>et al.</i> , 1998
<i>Paenibacillus sp.</i>	6,5		60-65	50%, 55 °C, 4jrs	181 000 (homo-tetramère)		Cu ²⁺ , xylitol	Mn ²⁺ , Co ²⁺	xylose, glucose	
<i>Bacillus thermoantarcticus</i>	7,0	5,5-10,0 25 °C, 2h	85		200 000 (homo-tetramère)	4,8		Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺		Lama <i>et al.</i> , 2001
<i>Thermanaero-bacterium sp</i>	6,4		80-85	50%, 1h à 82 °C	200 000 (homo-tetramère)	4,7	Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	xylose, glucose	Liu <i>et al.</i> , 1996

Tableau 17 : Quelques propriétés de L-arabinose isomérase bactériennes.

Souches	pH opt	Stabilité au pH	T °C opt	Thermo-stabilité	Masse molaire (Da)	Inhibiteur	Activateur	Substrats	Références
<i>Escherichia coli</i>	6,0				362 000 (hexamère)	L-arabitol	Co ²⁺ (faible), Mn ²⁺	L-arabinose, D-fucose	Patrick et Lee, 1975 Banerjee et al., 1995
<i>Lactobacillus gayonii</i>	6,0	5,5-9,0, 10 min, 50 °C	40	50 °C, 10 min	271 000	Hg ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , xylitol, L-arabitol	K ⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺ , Sr ²⁺	L-arabinose, D-galactose	Nakamatu et Yamanaka., 1969 Yamanaka., 1975
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	7,0	7,5-10,5	45	50%, 50 °C, 10 min			Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	L-arabinose, D-galactose	Izumori et al., 1978
<i>Streptomyces sp.</i>	7,0	9,0, 10 min, 50 °C				xylitol	Mn ²⁺ , Co ²⁺	L-arabinose	Yamanaka et Izumori, 1975
<i>Thermotoga maritima</i>	7,5		85-90	50%, 90 °C, 185 min	230 000 (homo-tetramère)		Mn ²⁺ , Co ²⁺ Faible : Ca ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ²⁺	L-arabinose, D-galactose	Lee et al., 2004
<i>Thermotoga neapolitana</i>	7,0	5,5-10,0 25 °C, 2h	85	50%, 90 °C, 70 min			Co ²⁺ , Mn ²⁺	L-arabinose, D-galactose	Kim et al., 2002

Typiquement, le pH optimal des enzymes D-xylose isomérases disponibles dans le commerce est de 6,5 à 9,0. Ceci limite la température de réaction utilisée dans les procédés industriels à 60 °C en raison de la formation de produits brunâtres (mannose et d'autres composés acides) dans les conditions de la température plus élevée et de pH alcalin. Cependant, la température plus élevée a l'avantage d'une concentration plus élevée en équilibre de fructose, d'une vitesse plus rapide de réaction, et d'une viscosité diminuée du substrat dans le produit. Par conséquent, une isomérase thermostable de glucose avec un pH optimal acide laisserait les températures plus élevées de réaction sans sous-produits indésirables et aurait une application industrielle potentielle. Elle est la plupart du temps activée en présence de Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} et inhibée par le xylitol, Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} .

En ce qui concerne l'enzyme L-arabinose isomérase, elle présente des caractéristiques assez différentes selon les souches utilisées. Ceci est toute fois relatif au vu du nombre de souches ou elle a été purifiée. Dans les caractéristiques communes que l'on peut retrouver, elle présente un pH optimal de 6,0 à 7,5 et est en général activée comme la xylose isomérase en présence d'ions bivalents le Mn^{2+} et le Co^{2+} . Pour les autres caractéristiques, on va retrouver de grandes différences au niveau de la masse molaire de 230 000 à 362 000 Da, une température optimale de 40 à 85 °C et des inhibiteurs très variés.

D.6. Régulation de l'expression des isomérases

D.6.1. La xylose isomérase

Les activités xylose isomérase et xylulose kinase et le transport du D-xylose sont en général induites quand des cellules sont en présence du D-xylose, négocié par l'intermédiaire de XylR. Chez les salmonelles et *E. coli*, XylR est un activateur quand le xylose est présent. Alors que dans les bactéries Gram +, XylR est un répresseur qui est inactivé quand le xylose se lie [Erlandson *et al.*, 2000].

Leur synthèse est souvent réprimée par les sources de carbone facilement assimilable telles que le D-glucose et d'autres hydrates de carbone comme le L-arabinose, le D-ribose ou le D-maltose. D'ailleurs, l'addition du D-glucose aux cellules croissant sur le D-xylose diminue les activités xylose isomérase et xylulose kinase, et l'activité de transport du D-xylose. En outre, il a été démontré que le gène de répresseur, xylR, des opérons xylose de *Bacillus subtilis* et de

Lactobacillus pentosus, est impliqué dans la commande négative d'un β -xylosidase et d'un gène codant pour une α -xylosidase, respectivement [Chaillou *et al.*, 1998].

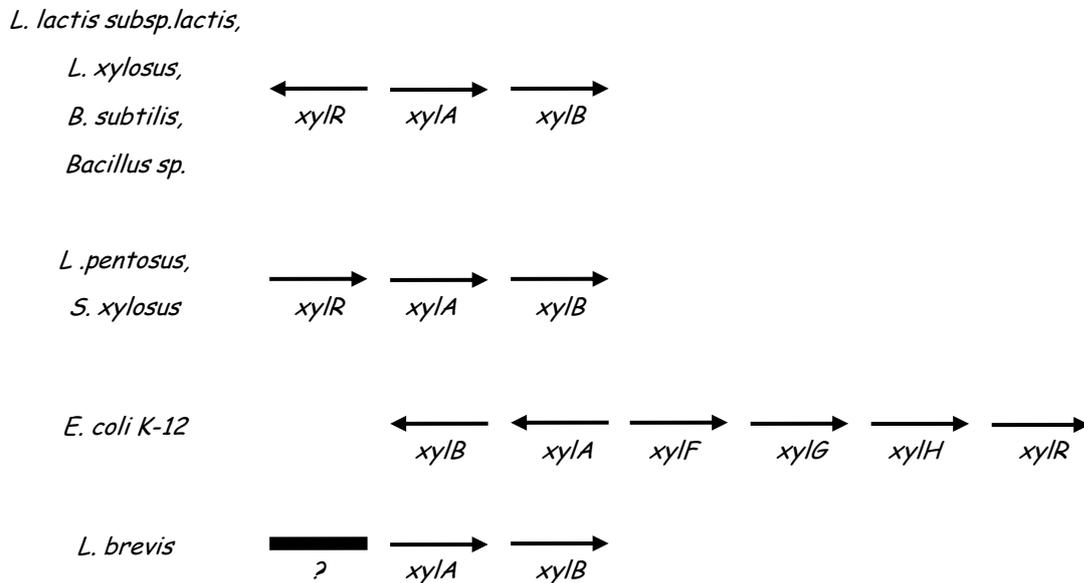


Figure 27 : Organisation de l'opéron xylose dans diverses bactéries. Le gène de **xylR** code une protéine de normalisation, **xylA** code une xylose isomérase, **xylB** code une xylulose kinase; le **xylF** code une protéine xylose-liante, le **xylT** code un transporteur de xylose, le **xylG** code une protéine d'ATP liante, et le **xylH** code un transporteur de membrane (type ABC- transporteur de xylose). ?, Armature ouverte ordonnancée de lecture de fonction inconnue [Chaillou *et al.*, 1998].

D.6.2. L'arabinose isomérase

Des études ont été menées principalement chez deux souches, *Bacillus subtilis* et *E. coli*, et ont permis de déterminer que cette enzyme fait partie d'un opéron arabinose *araABD* codant respectivement pour les activités L-arabinose isomérase, L-ribulokinase et L-ribulose-5-phosphate 4-épimérase. Cet opéron est sous le contrôle d'un promoteur P_{BAD} induit par le L-arabinose et réprimé par le D-glucose ou le glycérol [Sa-Nogueira *et al.*, 1997 ; Khlebnikov *et al.*, 2000].

D.7. Immobilisation des isomérases

L'utilisation des enzymes immobilisées présente un grand intérêt pour différentes applications industrielles notamment pour la production des sucres, des acides aminés, et des drogues depuis plus de deux décennies [Saudagar et Singhal, 2004].

L'idée fondamentale d'immobiliser les enzymes est d'inclure la protéine dans un support semi-perméable, qui empêche l'enzyme de partir tout en permettant à des substrats, à des produits, et à des cofacteurs de passer à travers. Bien que les conditions exactes pour la matrice d'immobilisation sont dictées par le type d'enzyme et l'application prévue, il est clair que le matériel doit au moins être non dégradable et compatible avec les enzymes. Le procédé pour l'immobilisation doit également être assez doux pour ne pas dénaturer l'enzyme pendant la préparation [Taqieddin et Amiji, 2003].

Il existe deux possibilités d'immobiliser des enzymes :

- Soit en tant qu'enzymes libres : ceci nécessite une étape de purification induisant une perte partielle de celles-ci, mais est idéale pour des enzymes sécrétées ;
- soit en cellules entières : ceci est simple et idéale pour des enzymes intracellulaires puisqu'elle évite les étapes de purification. Cependant, des réactions parasites peuvent interférer sur le produit et entraîner sa dégradation.

L'immobilisation, d'une manière générale, permet d'avoir une meilleure stabilité des enzymes, mais peut induire des problèmes de diffusion et d'accessibilité au substrat contrairement aux enzymes libres. L'immobilisation peut être réalisée sur différents types de support, mais la plupart des supports présentent l'inconvénient d'être chers. Les principales méthodes pour préparer une enzyme immobilisée incluent l'adsorption, l'inclusion, la liaison covalente et l'encapsulation [Figure 28]. Quant aux matrices utilisées, on a principalement deux types qui sont les plus employées [Saudagar et Singhal, 2004 ; Bai et Zhou, 2004] :

- les polymères : l'agarose, la cellulose, les dextrans, les polymères tels que le chlorure polyvinylique, les acrylates, les nylons, le polystyrène. La matrice de polymère est aisément fonctionnelle et l'attachement de la protéine s'effectue facilement ;
- les matériaux inorganiques : la silice sous forme de billes de verre microporeuses et de gel de silice, peuvent doter les enzymes immobilisées des propriétés mécaniques sur la stabilité de pression.

Des hybrides de ces matières premières telles que l'amide d'agarose-acryl et la silice polymère-enduite ont été également employés pour l'immobilisation des enzymes.

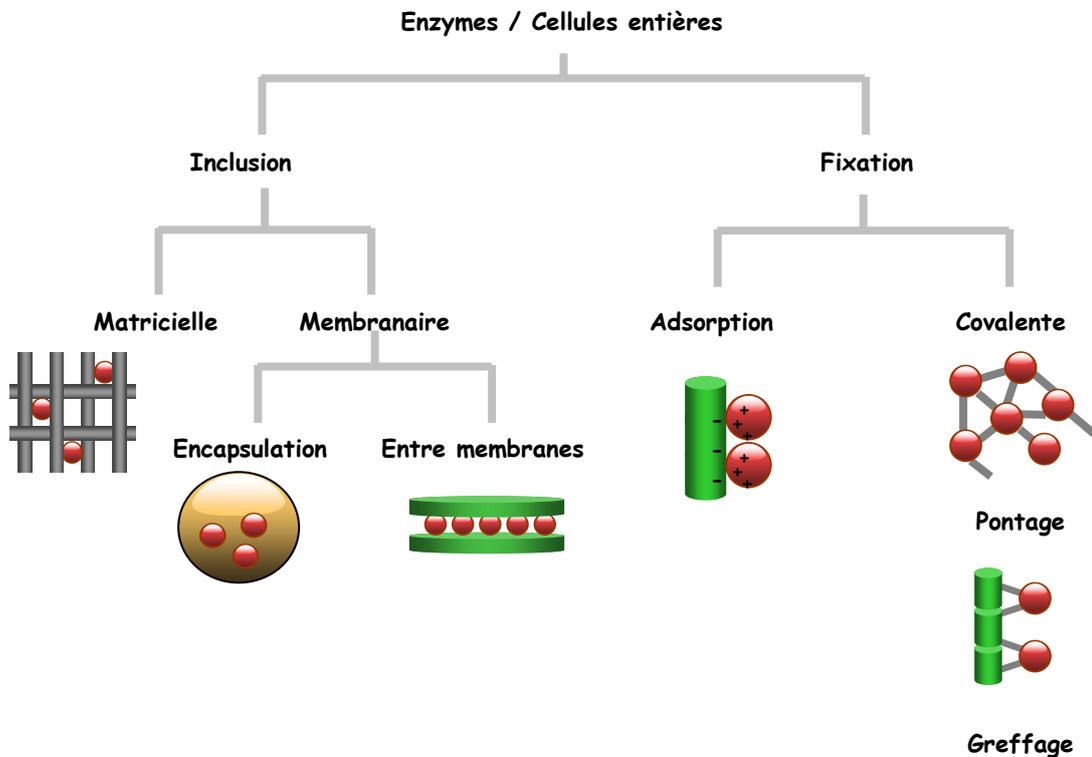


Figure 28 : Différentes méthodes d'immobilisation.

L'alginate est de loin le polymère le plus largement répandu pour les technologies d'immobilisation et de micro-encapsulation. L'alginate est un extrait d'algue composé de chaînes alternant les résidus d'acide α -L-gulonique et d'acide β -D-mannuroniques. Les supports d'alginate sont habituellement faits en réticulant le groupe carboxylique de l'acide α -L-gulonique avec un ligand cationique tel que le chlorure de calcium, le chlorure de baryum, ou le poly-(L-lysine). Les matrices d'alginate réticulées avec des ions de Ca^{2+} , sont cependant instables dans l'environnement physiologique ou dans les solutions tampons communes ayant une concentration élevée en ions phosphate et citrate qui peuvent extraire les ions Ca^{2+} à partir de l'alginate et liquéfient le système [Taqieddin et Amiji, 2003].

Les enzymes immobilisées déjà présentes sur le marché ont plusieurs avantages au niveau de leurs utilisations industrielles, mais également quelques inconvénients [Tableau 18].

Tableau 18 : Avantages et inconvénients des enzymes industrielles [Demirel *et al.*, 2004].

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • Économie d'énergie • Équipements adaptés... • Très haute spécificité enzymatique • Conditions douces d'utilisation (pH, T°C) • Peu de problèmes de stockage des préparations enzymatiques • Catalyseurs actifs à faibles doses • Très haute vitesse de réaction et contrôle facile • Synthèses régiospécifiques, stéréospécifiques,... • Biodégradables 	<ul style="list-style-type: none"> • Problèmes liés à la dénaturation des enzymes • Prix élevé de certaines applications • Nécessité de co-facteurs (Ca²⁺, ...) pour certaines réactions • Contrôle et ajustement du pH • Milieux réactionnels variés induisant des mécanismes enzymatiques complexes : <ul style="list-style-type: none"> - Catalyse homogène en milieux aqueux - Catalyse hétérogène (substrats insolubles, réactions en milieu organique)

D.8. Applications industrielles des isomérases

La D-glucose/D-xylose isomérase (GI) est une des trois plus importantes enzymes en valeur de tonnage au niveau industriel, les deux autres étant les amylases et les protéases. Selon Wiseman, la GI peut être la plus importante de toutes les enzymes industrielles du futur [Wiseman, 1975].

L'isomérisation du glucose au fructose est d'importance commerciale dans la production du sirop de maïs à haut pourcentage de fructose (HFCS). Le saccharose dérivé de la betterave à sucre (40%) et de la canne à sucre (60%) était l'édulcorant principal dans le Monde jusqu'en 1976. La production de HFCS en employant l'isomérase de glucose a été développée d'abord au Japon et plus tard aux États-Unis. La GI a gagné l'importance commerciale aux États-Unis en raison du manque d'approvisionnement en saccharose après la révolution cubaine en 1958, et elle continue à être l'une des enzymes industrielles les plus importantes à ce jour [Bhosale *et al.*, 1996].

L'enzyme est habituellement employée sous une forme immobilisée, ce qui fait que son utilisation représente la plus grande demande d'enzymes immobilisées en industrie. La xylose isomérase est industriellement produite en grande quantité à partir de souches du genre *Streptomyces* [Pastinen *et al.*, 1999].

En ce qui concerne l'arabinose isomérase, elle est également utilisée sous forme immobilisée en industrie pour la production du céto-hexose D-tagatose. Ce dernier a le potentiel pour être utilisé en tant que substitut de sucre dans la nourriture. En effet, le D-tagatose a un goût et a un équivalent de la valeur de douceur (92%) au saccharose. Ce composé s'est également avéré être un édulcorant à basses calories dans les produits alimentaires [Lee *et al.*, 2004]. Il est également utile comme intermédiaire pour la synthèse d'autres composés optiquement actifs et comme additif dans la formulation de détergents, de produits cosmétiques et pharmaceutiques [Kim *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2001].

E. But des études

Le but de cette étude est d'utiliser et de valoriser les glucides, les hexoses et principalement les pentoses, présents dans le sirop de son de blé. Les travaux vont s'axer, dans un premier temps, sur la production d'acide lactique en bioréacteur à partir d'une bactérie lactique et d'optimiser cette production afin d'une part d'améliorer le rendement et d'autre part de diminuer les coûts de production.

Dans un deuxième temps, divers protocoles, de caractérisation et de quantification des cétooses obtenus à partir d'isomérases ou de détection de l'activité L-arabinose isomérase, seront réalisés.

Puis, dans une dernière partie, les essais se porteront sur la production, la purification et la caractérisation de deux isomérases, la L-arabinose isomérase et la D-xylose isomérase. En parallèle de la purification, des tests d'immobilisation de ces activités enzymatiques seront réalisés pour améliorer la productivité et la stabilité de celles-ci.

Matériel et Méthodes

A. Les souches bactériennes lactiques hétérofermentaires utilisées

Les souches employées pour le criblage des activités isomérases et la production d'acide lactique ont été commandées à la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) :

- *Lactobacillus bifementans* DSM 20003 ;
- *Lactobacillus pentosus* DSM 20199 ;
- *Lactobacillus casei* DSM 20011 ;
- *Lactobacillus curvatus* DSM 20495 ;
- *Lactobacillus plantarum* DSM 20205
- *Leuconostoc mesenteroides* DSM 20193.

B. Conditions de cultures des microorganismes**B.1. Pré-culture**

Les inoculations sont réalisées à partir de souches cultivées en micro-aérophilie dans un bouillon d'enrichissement spécifique, le milieu MRS (milieu nutritif mis au point par De Man, Rogosa et Sharpe, Biokard Diagnostics) qui est un milieu riche contenant :

- 10 g/L d'extrait de levure ;
- 5 g/L d'extrait de viande ;
- 10 g/L de peptone de caséine ;
- 10 g/L de glucose ;
- 1 g/L de Tween 80 ;
- 2 g/L de phosphate dipotassique (K_2HPO_4) ;
- 5 g/L d'acétate ou de citrate de sodium (CH_3COONa ou $C_6H_5 Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ;
- 2 g/L de sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$) ;
- 0,2 g/L de sulfate de magnésium héptahydraté ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ;
- 0,05 g/L de sulfate de manganèse monohydraté ($MnSO_4 \cdot H_2O$).

Le pH final après autoclavage est ajusté à $6,8 \pm 0,2$ et les bactéries sont cultivées 24 h à 35 °C.

B.2. Milieux de culture et inoculums

Les milieux sont tamponnés au pH optimal de la souche d'intérêt à température ambiante, à la soude ou à l'acide chlorhydrique concentré et sont ensuite stérilisés (20 min à 120 °C). Les milieux sont inoculés afin d'avoir une population initiale comprise entre $1 \cdot 10^7$ et $3 \cdot 10^7$ C/mL. Les cultures sont incubées à 35 °C dans une étuve sous agitation à 100 rpm.

B.3. Culture en fermenteur

B.3.1. Production de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase

Pour la production d'enzymes, une culture liquide de 160 L (volume total) de *Lactobacillus bifermantans* est réalisée en fermenteur de 200 L (New Brunswick Scientific, capacité totale de 200 L avec une capacité utile de 160 L), sur milieu MRS modifié sans glucose complété par 10 g/L de xylose ou d'arabinose. Le pH du milieu est ajusté à température ambiante après stérilisation à 120 °C pendant 20 min et après ajout du glucide inducteur de l'activité enzymatique qui nous intéresse. La culture est réalisée en condition optimale (35 °C à pH 6,8), sous agitation (150 rpm), et sous bullage d'azote. Le pH est contrôlé régulièrement et ajusté si nécessaire, avec de la soude 10 N. La culture débute après avoir ajouté un inoculum de 8 L (inoculation à 5%, v/v). La culture est arrêtée dès la fin de phase exponentielle pour effectuer une étude enzymatique.

B.3.2. Suivis de fermentation lactique

Les fermentations sont réalisées en fermenteur liquide ayant une capacité de 1 à 4 L (S.G.I., Setric Genie Industriel) avec la bactérie lactique du genre *Lactobacillus*, *L. bifermantans*. La souche a été testée sur milieu à base de sirop de son à une concentration finale d'environ 100 g/L (34 g de glucose, 42 g de xylose et 24 g d'arabinose) supplémenté par du milieu MRS sans glucose. Le pH du milieu est ajusté à température ambiante après autoclavage du réacteur à 120 °C pendant 20 min et après ajout du sirop de son. La culture est réalisée en condition optimale (35 °C à pH 7,0-7,5), sous agitation (150 rpm). Le pH est contrôlé régulièrement et ajusté si nécessaire, avec de la soude 10 N. L'inoculation est réalisée à 5% (v/v). La culture est arrêtée dès que la souche ne consomme plus de glucides ou ne produit plus d'acide lactique.

B.4. Suivi de la croissance

B.4.1. Dénombrement à la cellule de Thoma

Les dénombrements sont effectués par comptage direct sur cellule de Thoma au grossissement X400 à l'aide d'un microscope optique E600 (Nikon). Les prélèvements sont

réalisés de façon stérile à l'aide de seringues stériles. Les dilutions, quand elles ont été nécessaires pour un comptage correct, sont réalisées avec de l'eau stérile contenant 0,5 M de sel (NaCl).

B.4.2. Estimation de la biomasse au spectrophotomètre

Elle s'effectue par la mesure de l'intensité de la lumière transmise I_t par rapport à l'intensité de la lumière incidente I_i et selon la loi de Beer Lambert :

$$A = \log I_i / I_t.$$

La densité optique est mesurée à 600 nm (Uvikon 931, Kontron). Il existe une absorbance limite qui est de 2 car cette technique n'est valable que pour de faibles concentrations microbiennes. Au préalable, pour chaque souche une gamme étalon est réalisée prenant en compte la population en fonction de la densité optique.

C. Préparation du matériel biologique

C.1. Isolement du contenu intracellulaire : à partir de culture en petit volume

Les cultures sont centrifugées 1 h à 9 000 g, et à 4 °C (centrifugeuse JOUAN, MR 1812). Le surnageant est éliminé, et la pâte cellulaire est soigneusement prélevée. Les cellules sont finalement resuspendues dans un tampon adéquat, en général un tampon Tris-HCl 100 mM à pH 7,5 + 0,04% d'azoture de sodium (p/v).

Les cellules sont lysées par sonication, à 4 °C (pulses de 5 s à 5 s d'intervalle pendant 45 min). Le culot membranaire est éliminé après centrifugation à 9 000 g pendant 60 min, et à 4 °C, et le contenu intracellulaire, ainsi obtenu, peut être conservé à la même température.

C.2. Isolement du contenu intracellulaire : À partir de culture en fermenteur

La pâte cellulaire est obtenue par centrifugation en continu (centrifugeuse CEPA) à 17 000 g puis resuspendue dans un tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, pour les études enzymatiques. Dans tous les cas, la solution utilisée contient 0,04% d'azoture de sodium (p/v).

Les cellules sont ensuite cassées au désintégrateur de cellules « Basic Z » (1,2 kbar à 4 °C). Les culots membranaires sont éliminés après centrifugation à 12 000 g pendant 30 min à 4 °C (centrifugeuse JOUAN, KR 22), et le contenu intracellulaire, ainsi obtenu, peut être conservé à la même température.

D. Les différents substrats utilisés

D.1. Les glucides

Nous avons étudié le développement et la fermentation éventuelle des micro-organismes sur les trois glucides les plus courants dans les résidus hémicellulosiques et qui sont présents en grande quantité dans le sirop de son, à savoir : le glucose, le xylose et l'arabinose (Sigma-Aldrich).

D.2. Le sirop de son de blé

Le sirop de son de blé fourni par le groupe industriel A.R.D. (service fractionnement et pilote) est utilisé comme substrat pour la production d'éthanol. Il est important de remarquer que ce sirop contient une proportion importante de sucres et dont la composition donnée par l'industriel est la suivante :

Tableau 1 : Composition du sirop de son de blé.

Matière sèche (MS) : 76,35% par méthode Karl Fisher.

Sucres :

<u>par CLHP :</u>	<u>par CPG :</u>
Arabinose : 21,62% sur MS	Arabinose : 21,7% sur MS
Xylose : 38,85% sur MS	Xylose : 35,9% sur MS
Glucose : 31,83% sur MS	Glucose : 31,5% sur MS
Total sucres : 92,30% sur MS	Mannose+galactose : 1,8% sur MS
	Diholosides : 2,7% sur MS
	Total sucres : 93,6 % sur MS

Cendres (minéraux totaux) : 0,17% sur MS

Protéines : 0,8% sur MS

Autres : Colorants, anions organiques, cations organiques, polymères non identifiés (osides).

E. Les plans d'expériences

La méthode des plans d'expérience est un modèle statistique permettant à un expérimentateur de limiter le nombre d'essais à réaliser lors d'une expérimentation afin de déterminer une réponse pour un grand nombre de facteurs étudiés.

En effet, un phénomène étudié peut toujours être modélisé sous la forme mathématique :

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_n).$$

Y étant la grandeur ou réponse à laquelle l'expérimentateur s'intéresse, f la fonction mathématique exprimant le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs des facteurs (ou variables appelées x_i).

Cette méthode consiste en une variation raisonnée des niveaux de tous les facteurs en même temps pour chaque essai. Les plans d'expérience vont ainsi permettre d'étudier l'influence simultanée d'un grand nombre de facteurs, de leurs interactions, pour conduire à une optimisation des conditions.

E.1. Plans factoriels complets à deux niveaux 2^k

Les plans factoriels complets à deux niveaux sont les plus simples et permettent d'établir une base pour tout début d'expérimentation. Le principe de ce type de plan consiste en l'utilisation d'un niveau haut (+1) et d'un niveau bas (-1) pour un facteur x_i afin d'étudier son influence, sans pour autant faire varier celui-ci de manière trop importante. Les variations de ce facteur seront ainsi limitées par deux bornes.

Les plans factoriels complets 2^k prennent en compte l'étude de k facteurs ayant chacun deux niveaux. Une représentation géométrique peut être établie. Nous prendrons l'exemple de deux facteurs étudiés ayant chacun deux niveaux [\[Figure 1\]](#).

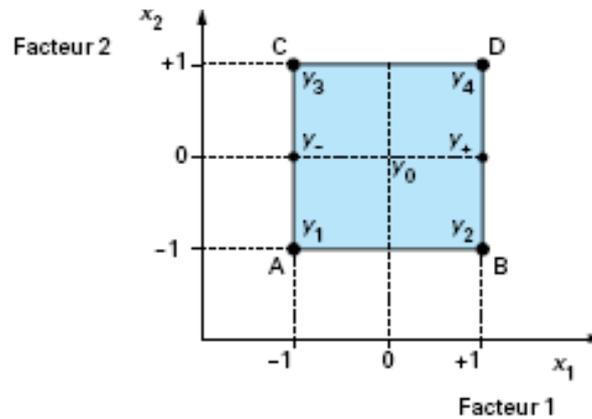


Figure 1 : Représentation géométrique d'un domaine expérimental de 2 facteurs à 2 niveaux.

Le carré bleu représente le domaine d'étude auquel l'expérimentateur s'intéresse. Chaque point de ce carré peut être l'objet d'une expérience. Afin de limiter le nombre d'expérience, l'expérimentateur établit une loi du premier degré, permettant de se limiter à deux essais par facteurs, et exprimant l'évolution de la réponse en fonction des facteurs :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2$$

Les meilleures expériences se situent au sommet du carré représentant le domaine d'étude (points A, B, C, D). Une matrice d'expérience correspondante au domaine d'étude est établie [Tableau 1].

Tableau 2 : Matrice d'expérience d'un plan factoriel complet 2^2 .

Essai	Facteur 1	Facteur 2
1 (A)	-1	-1
2 (B)	+1	-1
3 (C)	-1	+1
4 (D)	+1	+1

Des essais concernant les points au centre du domaine d'étude sont en général réalisés afin de confirmer la validité du modèle et sa reproductibilité. Ils permettront également d'établir un intervalle de confiance entre la moyenne calculée à partir du modèle et la moyenne mesurée lors des expérimentations.

E.2. Plan de Plackett et Burman [Plackett et Burman, 1944]

Ce sont des plans factoriels fractionnaires simplifiés qui permettent de réaliser un modèle d'ordre 1 pour k facteurs à 2 niveaux. Cependant, ceux-ci ne permettent de déterminer que les effets principaux des facteurs, sans prendre en compte les interactions puisqu'ils sont confondus. Pour exemple, l'étude de 6 facteurs se limite à 8 essais, correspondant à un plan factoriel complet 2^3 avec 3 interactions d'ordre 2. Ce type de plan est construit selon des matrices n'existant que lorsque le nombre d'essais est un multiple de 4. Le modèle mathématique de ce type d'étude est : $y = a_0 + \sum a_i x_i$

Cette première analyse nous permet de garder les facteurs les plus importants pour effectuer un plan de modélisation plus complet afin d'étudier le phénomène de façon plus approfondie. L'interprétation des résultats reste cependant très limitée dans ce type de plan fractionné et ne permet pas d'établir d'optimum.

E.3. Plan d'optimisation et de modélisation

Au cours de ces études d'optimisation et de modélisation, nous avons utilisé différents plans composites centrés tels que le plan CCF (Central Composite Face) et le plan CCC (Central Composite Circumscribed). Chacun de ces 2 plans est composé d'un plan factoriel 2^k , de points centrés et de points en étoile [Figure 2].

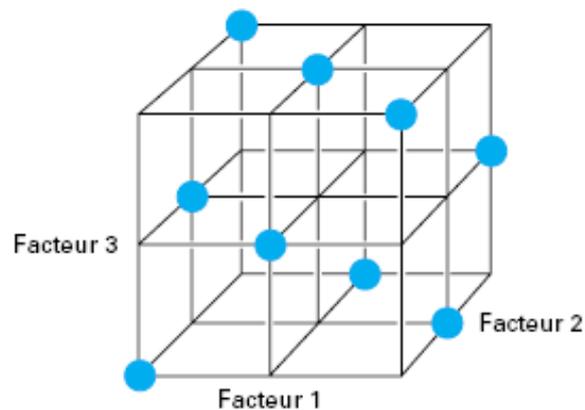


Figure 2 : Représentation du domaine expérimental d'un plan CCF.

La différence principale entre les 2 plans réside dans la distance des points en étoile. On retrouve ces points sur l'axe de chacun des facteurs. Pour le plan CCF, les points sont sur la face des côtés du cube, pour le plan CCC, la distance de ces points par rapport au centre du domaine est déterminée en fonction du nombre de sommets, c'est-à-dire au nombre de facteurs.

Tableau 3 : Exemple d'une matrice d'un plan CCF à 3 facteurs.

Essais	X ₁	X ₂	X ₃	
1	-1	-1	-1	Plan Factoriel
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	0	0	Points en Étoile
10	+1	0	0	
11	0	-1	0	
12	0	+1	0	
13	0	0	-1	
14	0	0	+1	
15	0	0	0	Points Centrés
16	0	0	0	
17	0	0	0	
18	0	0	0	

Pour étudier l'impact des facteurs et modéliser la réponse sous forme d'équation, l'intégration par calcul matriciel est réalisée à l'aide du logiciel STATISTICA 6.1 (Statsoft, Inc., France). Ainsi, on peut étudier le phénomène, c'est-à-dire la réponse Y , soit en cherchant des optimums/minimums, u en fixant un des paramètres par exemple. La représentation graphique va nous permettre de visualiser rapidement le phénomène en fonction des facteurs étudiés.

E.4. Conditions de culture

Les essais des plans d'expériences sont réalisées en tube fermé de 50 mL, afin d'obtenir les conditions de micro-aérophilies, avec la bactérie lactique *L. bifementans*. La culture est effectuée à partir d'un volume de 40 mL sur un milieu à base de sirop de son de blé, à une

concentration finale en sucres réducteurs d'environ 35 ± 5 g/L et complété par du milieu MRS modifié sans glucose avec ajout de 2,5 mM de Mn^{2+} .

Pour chaque constituant du milieu, une solution mère (x 20) a été préparée et ces solutions ont été stérilisées séparément (120 °C, 20 min). Après réalisation du milieu à partir des solutions mères, pour chaque essai déterminé par le plan d'expérience, le sirop de son a été ajouté à l'aide d'un répartiteur automatique. Ensuite, le pH du milieu est ajusté à température ambiante. La culture est réalisée en condition optimale (35 °C à pH 7,0-7,5), dans une étuve sous agitation (100 rpm) pour une durée de culture de 14 h en micro-aérophilie.

De plus, pour chaque essai testé, un comptage de la population cellulaire et un dosage des sucres réducteurs ont été réalisés au départ et en fin de culture.

F. Méthode analytique

F.1. Dosage des protéines intracellulaires

Les quantités de protéines sont estimées selon la méthode de [Bradford \[1976\]](#), via le réactif commercialisé par la société Bio-Rad.

Cette technique permet de doser des quantités de protéines comprises entre 20 et 140 μg , pour la méthode standard, et entre 2 et 9 μg pour la micro-méthode. Le dosage consiste, dans un premier temps, à ajouter 800 μL d'échantillon, convenablement dilué, à 200 μL de réactifs de Bradford. Le mélange, après homogénéisation, est ensuite placé 15 min à l'obscurité, et la densité optique est finalement mesurée à 595 nm (Uvikon 931, Kontron).

Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire à partir d'une gamme étalon contenant de l'albumine de sérum bovin.

F.2. Dosage du fructose, du ribulose et du xylulose

Ce dosage spectrophotométrique est issu de la publication : A microplate assay for D-xylose / D-glucose isomérase [[Schenk and Bisswanger, 1998](#)].

Pour cela 450 μl de solution A (mélange H_2O / Éthanol (1 :1, v/v) avec 0,05% de Résorcinol) sont ajoutés à 450 μl de solution B (0,054 g FeNH_4SO_4 dissous dans de l'HCl concentré) et 270 μl H_2O , puis 30 μl d'échantillon à doser. Le tout est ensuite porté à 80 °C pendant 40 min avant de réaliser la lecture de l'absorbance :

- à 450 nm pour le fructose ;
- à 535 nm pour le ribulose ;
- à 665 nm pour le tagatose ;
- à 630 nm pour le xylulose.

Une gamme étalon allant de 0 à 10 mM de chaque cétose a été réalisée.

F.3. Dosage des sucres réducteurs

Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode 3-5 DNS. 0,1 mL d'échantillon est ajouté à 0,1 mL de DNS. Le mélange est ensuite porté à 100 °C pendant 5 min puis refroidi dans de la glace afin d'arrêter la réaction. On ajoute enfin 1 mL d'eau distillée avant de réaliser la lecture de la densité optique à la longueur d'onde de 540 nm.

Des gammes étalons allant de 0 à 5 g/L ont été réalisées pour chaque glucide utilisé dans notre étude. Les résultats qui présentent une différence de densité optique : ΔA (A échantillon - A milieu témoin) supérieure à 2,00 ne sont pas pris en compte, car ils sont hors gamme.

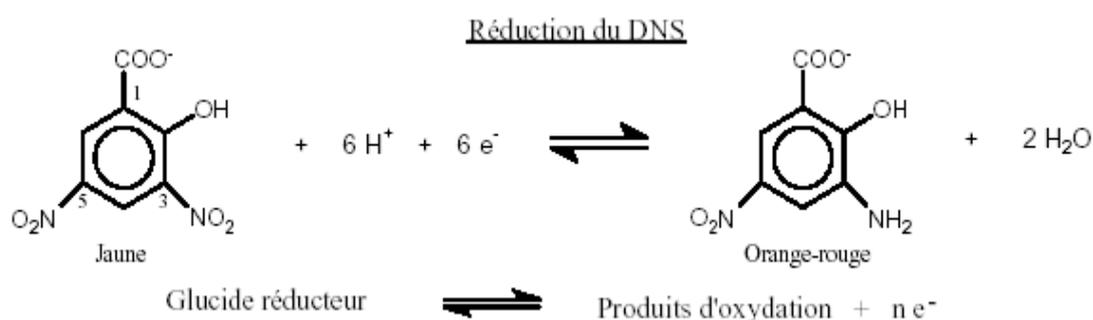


Figure 3 : Principe du dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS.

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé [Figure 3].

La chimie de la réaction est complexe et la réaction d'oxydoréduction avec les glucides n'est pas stœchiométrique, les courbes d'étalonnage ne passent pas toujours par l'origine et les différents sucres donnent des colorations variables.

F.4. Dosage enzymatique

F.4.1. Dosage de l'acide lactique

Le dosage enzymatique de l'acide lactique est effectué grâce au kit D- et L- Lactic acid « Enzymatic Bioanalysis / Food Analysis » (R-Biopharm, ref. 11112821035) par méthode U.V. des laboratoires ROCHE®.

Le dosage consiste à faire agir l'enzyme D- ou L- lactate déshydrogénase (LDH) respectivement sur le D- ou L-Lactate qui vont être oxydés en pyruvate en présence de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), entraînant la formation de NADH réduit. Une réaction parallèle à celles-ci est réalisée entre le pyruvate formé et le L-glutamate entraînant la formation d'oxoglutarate et de L-alanine grâce à la glutamate-pyruvate transaminase (GPT). Cette réaction va ainsi permettre de piéger le pyruvate et d'éviter de reformer du lactate. Les concentrations des formes optiques D- et L- de l'acide lactique seront alors déterminées de manière stœchiométrique, l'une après l'autre, grâce au NADH formé par une lecture d'absorbance à 340 nm.

200 μL de NAD et 200 μL de GPT sont ajoutés à 1 ml de tampon glycylglycine avec de l'acide glutamique à pH 10,0 et 900 μl d'eau distillée. Puis, on déclenche la réaction par l'addition de 100 μl d'échantillon à ce milieu, après 5 min lecture de l'absorbance initiale à 340 nm (A1). On ajoute ensuite 20 μL de D-LDH et au bout de 30 min, la réaction est complète, lecture de la deuxième absorbance (A2), ce qui nous permet de déduire le D-Lactate. Pour finir, on ajoute 20 μL de L-LDH et au bout de 30 min, la réaction lecture de la troisième absorbance (A3), qui va nous permettre d'obtenir la quantité de L-Lactate.

La concentration en acide lactique (en g/L) est ensuite déterminée grâce à la formule suivante, pour le D-Lactate $\Delta A = A2 - A1$ et pour le L-Lactate $\Delta A = A3 - A2$:

$$C = ((V \cdot PM) \div (\Sigma \cdot d \cdot v \cdot 1000)) \cdot \Delta A \text{ [g/L]}$$

- V : volume de l'essai (mL) ;
- v : volume de l'échantillon (mL) ;
- PM : poids moléculaire de la substance à doser (g/mol) ;
- d : épaisseur de la cuve (1 cm) ;
- Σ : coefficient d'absorption du NADH (= 6,3 L.mmol⁻¹.cm⁻¹ à 340 nm).

F.4.2. Dosage de l'acide acétique

Le dosage de l'acide acétique est effectué par une méthode UV à l'aide du kit « Enzymatic Bioanalysis / Food Analysis » (R-Biopharm, ref. 10148261035) des laboratoires ROCHE®.

L'acétate est converti en acétyl-CoA en présence d'acétyl-CoA synthétase, d'ATP et de coenzyme A. L'acétyl-CoA formé lors de cette réaction, va alors réagir avec de l'oxaloacétate pour donner du citrate grâce à la citrate synthétase. L'oxaloacétate nécessaire à cette réaction est produit par une réaction entre le L-Malate et le NAD⁺ faisant intervenir la L-Malate déshydrogénase. Le NADH résultant de cette réaction, de manière stœchiométrique, servira à la détermination de l'acide acétique à l'aide d'un spectrophotomètre à 340 nm.

200 µL constitué d'ATP, d'acétyl-CoA et de NAD sont ajoutés à 1 mL de tampon composé de triéthanolamine, d'acide malique et de chlorure de magnésium, et avec 1,9 mL d'eau distillée. Puis, on ajoute 100 µL d'échantillon à ce milieu, après lecture de l'absorbance initiale à 340 nm (A0). On déclenche ensuite la réaction par l'addition de 10 µL de L-Malate déshydrogénase / Citrate synthétase et au bout de 3 min, lecture de la deuxième absorbance (A1). Pour finir, on ajoute 20 µL d'acétyl-CoA-synthétase et lecture de la troisième absorbance après 10-15 min (A2).

La concentration en acide lactique (en g/L) est ensuite déterminée grâce à la formule suivante :

$$C = ((V \cdot PM) \div (\Sigma \cdot d \cdot v \cdot 1000)) \cdot \Delta A \text{ [g/L]}$$

$$\text{avec } \Delta A = ((A2 - A0)_{\text{Ech}} - (A1 - A0)_{\text{Ech}}^2 / (A2 - A0)_{\text{Ech}}^2) - ((A2 - A0)_{\text{Blanc}} - (A1 - A0)_{\text{Blanc}}^2 / (A2 - A0)_{\text{Blanc}}^2)$$

F.4.3. Dosage du glucose et du fructose

▪ Dosage du glucose

Le dosage enzymatique du glucose est effectué grâce au kit glucose « D (+) Glucose, ACS Reagent » (R-Biopharm, ref. 10716251035) par méthode U.V. des laboratoires ROCHE®.

En présence d'ATP (Adénosine Tri Phosphate) le D-glucose est phosphorylé en glucose-6-P par l'Hexokinase (HK). Ensuite, l'ajout de la Glucose-6-P Déshydrogénase au milieu permet la

formation de gluconate-6-P. Cette dernière réaction nécessite le coenzyme NADP⁺ qui va être réduit en formant du NADPH + H⁺. Par conséquent, une mole de glucose permet la formation d'une mole de coenzyme réduit, cette réaction étant estimée par la lecture de la densité optique à 340 nm.

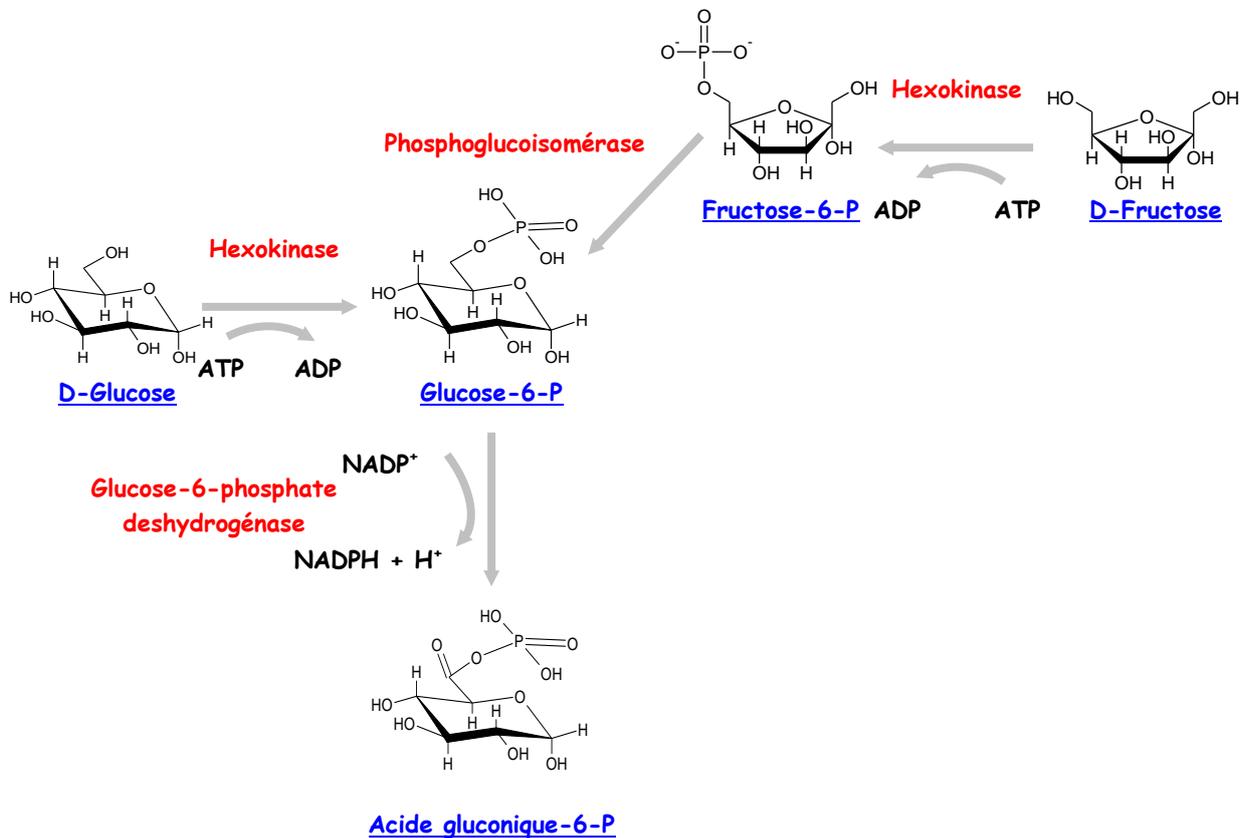


Figure 4 : Principe du dosage du glucose/fructose selon le kit commercial de R-Biopharm.

Le mélange réactionnel est réalisé en ajoutant 250 μ l de solution (triéthanolamine à pH 7,6, NADP 110 mg, ATP 260 mg et magnésium sulfate) à 475 μ l d'H₂O et 5 μ l de solution (G6P-DH et HK) puis lecture de l'absorbance à 340 nm (A0). On déclenche ensuite la réaction par l'addition de 25 μ l d'échantillon (dilué ou non). Au bout de 10 min, la réaction est complète, lecture de la deuxième absorbance (A1). La concentration en glucose (en g/L) est ensuite déterminée grâce à la formule suivante :

$$C = ((V \cdot PM) \div (\Sigma d \cdot v \cdot 1000)) \cdot \Delta A$$

- **Dosage du fructose**

Le dosage enzymatique du fructose est effectué grâce au kit glucose-fructose « D (+) Glucose / D (+) Fructose, ACS Reagent » (R-Biopharm, ref. 10139106035) par méthode U.V..

Les deux premières étapes sont identiques à celles du kit de dosage pour le glucose, ceci permet de transformer tout le glucose restant en acide gluconique-6-P et par conséquent d'obtenir une première absorbance qui nous donne la quantité de glucose présent. La troisième étape consiste à ajouter une phosphoglucoisomérase qui va transformer le fructose-6-P en glucose-6-P, qui sera lui-même retransformé en gluconate-6-P et formation du NADPH + H⁺, ceci nous donnant une deuxième absorbance.

F.5. Chromatographie liquide haute performance : C.L.H.P.

Le système C.L.H.P. a permis la vérification de la production d'éthanol et de l'utilisation des sucres. La séparation des substances est fonction de leur répartition entre les deux phases qui interviennent dans l'analyse : une phase mobile (ou éluant) et une phase stationnaire.

Les analyses ont été effectuées par C.L.H.P. (Beckman Instruments France) équipée d'une colonne Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) thermostatée à 85 °C par un four (croco-cil). Deux pré-colonnes, une cationique H⁺ et une anionique CO₃⁻, préservent l'intégrité de la colonne. Les molécules d'éthanol, ainsi que les sucres, ont été détectées par un réfractomètre (Iota 2) ou par un D.D.L.31 (détecteur à diffusion de lumière commercialisé par EUROSEP Instruments).

La phase mobile est une solution d'acide sulfurique à 5 mM, filtrée et dégazée par passage dans une cuve à ultrasons. Le débit est de 0,6 mL/min et le volume d'échantillon injecté est de 20 µl. Avant l'injection, les échantillons sont filtrés à l'aide d'une membrane de 0,22 µm et passés sur Microcon (membrane de 10 kDa). Ceci permet de séparer les sucres et l'éthanol contenus dans le perméat, des protéines.

G. Techniques d'électrophorèse [Annexes 1 et 2]

Les électrophorèses sont réalisées à partir de gels de polyacrylamide dans des cuves électrophorétiques verticales (Mini Protean II, Bio Rad). Les gels (8,5 cm x 7 cm) ont une épaisseur de 1,5 mm. La migration est effectuée à 150 V, pendant 90 min, à température ambiante. Pour certaines manipulations particulières, comme l'électroélution, nous avons utilisé des grands gels (18 x 14 x 0,15 cm) et une cuve verticale V15-17 (Gibco BRL, Lifes Technologies). La migration est effectuée à 160 Volts pendant 3 h, à température ambiante.

Deux concentrations en acrylamide sont utilisées pour le gel de séparation : 7,5% et 10% (p/v). Le gel de concentration contient, quant à lui, 4% d'acrylamide (p/v).

G.1. Électrophorèses en condition natives

Ce type de gel ne contient pas d'agents dénaturants ; le tampon du gel de séparation est le TRIS/HCl 375 mM, pH 8,8, et celui du gel de concentration est le TRIS/HCl 125 mM, pH 6,8.

La composition du tampon de chargement, ajouté à l'échantillon, à raison de 10% (v/v), est la suivante : TRIS 50 mM, glycine 284 mM, glycérol 20%, 0,001% Bleu de Bromophénol. La migration s'effectue dans le tampon TRIS 25 mM, glycine 192 mM.

G.2. Électrophorèses en condition dénaturantes

Dans ces conditions, les gels de concentration et de séparation, ainsi que les tampons de chargement et de migration contiennent également 0,1% de SDS.

Avant migration, l'échantillon doit être préalablement dénaturé. Pour cela, 50 μ L de cet échantillon (pour une quantité de protéine d'environ 25 μ g au minimum) sont mélangés à 7,5 μ L d'une solution de SDS 10%, β -mercaptoethanol 50% (v/v). Le tout est finalement incubé 5 min à 100 °C, avant d'être déposé.

G.3. Électrophorèses en condition dénaturantes douces, ou « partiellement dénaturantes »

Nous avons mis au point cette technique particulière de zymogramme lorsque les enzymes étudiées ne supportaient pas les conditions de dénaturation classiques.

De plus, cette technique nous a également permis de visualiser les activités enzymatiques de façon nette et isolée, contrairement aux zymogrammes en condition natives, où la rigidité, et la structure compacte des protéines étudiées (Vieille et Zeikus, 2001), provoquent, de façon systématique, des traînées d'activités sur PAGE-SDS.

L'unique différence entre une électrophorèse « partiellement dénaturante », et une électrophorèse dénaturante classique tient simplement au fait que l'échantillon n'est pas préalablement dénaturé.

G.4. Techniques de colorations des protéines

Différentes techniques de coloration ont été employées : La coloration au bleu de Coomassie, la coloration au nitrate d'argent, et la coloration au TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) qui permet la détection des activités isomérases.

Le protocole relatif à chacune des techniques est rappelé en [Annexe 2](#).

G.5. Électroélution des protéines d'un gel de polyacrylamide

Après migration des protéines et renaturation du gel dans les conditions citées précédemment, le gel est ensuite posé à plat dans la chambre d'électroélution Bio-Rad (Whole Gel Eluter). La migration s'effectue sur l'épaisseur du gel pendant 1 h, à 200 mA, dans du tampon de migration natif.

H. L'activité arabinose isomérase et xylose isomérase

H.1. Mesure de l'activité

L'activité de l'arabinose isomérase est déterminée en mélangeant 180 μL d'échantillon enzymatique auquel on ajoute 120 μL de solution test (0,1 M PIPES, 50 mM CoCl_2 et 0,1 M arabinose ou galactose), le tout est homogénéisé. Le mélange est chauffé à 60 °C pendant 10 min. Le dosage permet de pouvoir suivre le taux de transformation de l'arabinose en ribulose.

L'activité de la xylose isomérase est déterminée en mélangeant 180 μL d'échantillon enzymatique auquel on ajoute 120 μL de solution test (0,1 M PIPES, 50 mM CoCl_2 et 0,1 M xylose), le tout est homogénéisé. Le mélange est chauffé à 55 °C pendant 20 min. Le dosage permet de pouvoir suivre le taux de transformation du xylose en xylulose.

Pour cela 450 μl de solution A (mélange H_2O / Éthanol (1 :1, v/v) avec 0,05% de Résorcinol) sont ajoutés à 450 μl de solution B (0,054 g FeNH_4SO_4 dissous dans de l'HCl concentré) et 225 μl H_2O , puis 75 μl d'échantillon à doser. Le tout est ensuite porté à 80 °C pendant 40 min avant de réaliser la lecture de l'absorbance à 535 nm pour le ribulose, 665 nm pour le tagatose et 630 nm pour le xylulose.

H.2. Paramètres physico-chimiques

H.2.1. Variation du pH en fonction de la température

Pour étudier l'évolution de l'activité en fonction de la température, il était nécessaire de connaître la variation des pH des tampons.

L'ajustement des pH se faisant à température ambiante, mais les cinétiques enzymatiques à températures élevées, il a fallu estimer les valeurs réelles des pH à ces températures. Les pH des tampons citrate phosphate et phosphate ne varient pas en fonction de la température (testé entre 20 et 70 °C). A l'inverse, les tampons 100 mM Tris-HCl et KCl / borate / NaOH présentent une variation de pH avec les changements de température. Ajusté à pH 8,65 à 25 °C, le tampon

Tris-HCl perd 0,107 unité pH tous les 5 °C jusqu'à 70 °C. Le tampon KCl / borate / NaOH ajusté à 8,94 à 25 °C perd 0,031 unité pH tous les 5 °C [Ladrat, 1993].

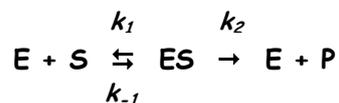
H.2.2. Détermination de la température et du pH optimum

Pour cela, nous avons fait des essais à différents pH avec des tampons allant de pH 4,0 à 9,0 pour chaque température de 30° à 90 °C. Les activités sont dosées selon le protocole expliqué ci-dessus [Chapitre H.1.].

H.2.3. Étude des paramètres cinétiques

▪ Rappels d'enzymologie et interprétation des données cinétiques :

Les mesures de cinétique des réactions enzymatiques sont les techniques les plus performantes pour élucider les mécanismes catalytiques des enzymes. La réaction enzymatique se déroule en deux étapes avec dans un premier temps la formation d'un complexe enzyme (E) - substrat (S) ES et qui ensuite se décompose pour donner les produits P et l'enzyme non modifiée :



Si l'on considère que l'on atteint l'état stationnaire qui signifie que la concentration du complexe enzyme-substrat est inchangée au cours de la réaction, on peut exprimer la cinétique de la réaction sous la forme :

$$v = V_m \cdot [\text{S}] / (K_m + [\text{S}]) \quad \text{avec } K_m = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Cette expression est l'équation de Michaelis-Menten, où V_m est la *vitesse maximale* atteinte par l'enzyme, et K_m la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale, appelée *constante de Michaelis-Menten*. On peut aussi définir la constante catalytique d'une enzyme :

$$k_{cat} = V_m / [\text{E}]_{tot}$$

Cette valeur est appelée le *turn-over number* d'une enzyme, car elle est égale au nombre de molécules de substrat converties en produit par unité de temps par une seule molécule d'enzyme

à saturation. Dans le modèle de Michaelis-Menten, quand $[S] \ll K_m$ alors $k_{cat} = k_2$; l'équation de vitesse devient alors :

$$v = (k_{cat}/K_m) \cdot [E] \cdot [S]$$

Dans cette équation k_{cat}/K_m est la constante de vitesse d'ordre deux de la réaction enzymatique, la vitesse varie selon la fréquence des rencontres entre l'enzyme et le substrat. L'expression k_{cat}/K_m permet de mesurer l'efficacité catalytique de l'enzyme.

Il est particulièrement intéressant de calculer la limite supérieure de l'efficacité catalytique :

$$k_{cat}/K_m = k_2/k_m = k_1 \cdot k_2 / (k_{-1} + k_2)$$

Ce rapport est maximum lorsque $k_2 \gg k_{-1}$ d'où $k_{cat}/K_m = k_1$, la constante de vitesse d'ordre deux pour la formation du complexe ES. La valeur de k_1 ne peut naturellement pas être supérieure à la fréquence avec laquelle les molécules d'enzyme et de substrat se rencontrent dans la solution. Cette limite physico-chimique, contrôlée par diffusion, est de l'ordre de 10^8 à $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Donc des enzymes dont les valeurs du rapport k_{cat}/K_m sont de cet ordre catalysent une réaction chaque fois qu'elles rencontrent une molécule de substrat.

L'équation de Michaelis-Menten étant une hyperbole équilatère, la détermination des paramètres cinétiques à partir de son tracé est très imprécise. Afin de surmonter ce problème, des transformations de l'équation ont été introduites, pour obtenir une relation linéaire. Plusieurs représentations ont été décrites, la plus connue étant la représentation de Lineweaver-Burk :

$$1/v = f(1/[S])$$

- **Mesures des paramètres cinétiques :**

Les caractéristiques enzymatiques de l'enzyme, K_m et V_m , ont été déterminées à 60°C et à pH 7,0 pour l'arabinose isomérase et à 55°C et à pH 7,5 pour la xylose isomérase. Les calculs de paramètres cinétiques ont été réalisés à partir de différentes concentrations en arabinose, tagatose et xylose allant de 0,01 à 1 M de glucides. L'activité enzymatique est déduite de l'utilisation d'une gamme étalon du substrat utilisé de concentration connue.

On trace ensuite le graphique $A_{nm} = f(t)$ pour l'activité enzymatique. En tenant compte des différentes dilutions, le rapport des pentes donne l'activité enzymatique exprimée en μg de ribulose (tagatose ou xylulose)/min/mL que l'on convertit en μmol de ribulose (tagatose ou

xylulose)/min/mL. Une unité enzymatique (U) équivaut à la libération de l'équivalent d'une micromole de ribulose (tagatose ou xylulose)/min. Il sera aussi particulièrement utile de calculer l'activité spécifique AS d'une enzyme, exprimée en U/mg d'enzyme, grandeur très importante pour la comparaison de différentes enzymes.

H.3. Purification de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase

H.3.1. Le matériel

Le travail de purification a été réalisé avec un système de chromatographie basse pression Gradifrac commercialisé par Pharmacia™ Biotech et Akta-prime commercialisé par Amersham/ Pharmacia™ Biotech. Toutes les étapes de purification ont été menées à température ambiante. Pour éviter les problèmes de contaminations microbiennes (qui augmenteraient les risques de protéolyse), dans chaque éluant a été rajouté 0,02% d'azoture de sodium. Les solutions tampons, qui servent d'éluant, sont dégazées et filtrées sur 0,22 µm.

H.3.2. Concentration des protéines

Les protéines ont été concentrées par passage sur une cellule d'ultrafiltration (Amicon, Grace SA, France) équipée d'une membrane avec un seuil de coupure de 10 kDa.

H.3.3. Techniques de séparation des protéines

- **Chromatographie par échange d'ions**

L'extrait enzymatique concentré est déposé sur une colonne échangeuse d'ions XK 50 (8 cm x 30 cm) remplie d'un gel Q-sepharose High Performance (Amersham-Pharmacia™ Biotech). La colonne est équilibrée avec du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, avant dépôt d'environ 70 mg de protéines. L'élution est réalisée avec un gradient discontinu croissant de NaCl (de 0 à 1 M) ajouté au tampon cité précédemment. Le débit est de 30 mL/min et les fractions collectées de 14 mL. Les fractions, où se trouve l'activité isomérase, sont regroupées, concentrées et diafiltrées par UF sur 10 kDa avec un tampon phosphate 50 mM pH 7,0.

- **Chromatographie d'exclusion**

L'échantillon enzymatique est déposé sur une colonne Hiprep 16/60 Sephacryl S-200 (Amersham-Pharmacia™ Biotech) à raison de 9 mg de protéines par passage. La colonne est lavée et équilibrée par du tampon phosphate 100 mM pH 7,0 contenant 100 mM de NaCl, afin de réduire les interactions avec le support. Un débit de 0,5 mL/min est appliqué et des fractions de 1,5 mL sont collectées. L'étalonnage de la colonne est réalisé pour déterminer la masse moléculaire de l'enzyme étudiée [Annexe]. Les coefficients de partage (K_{av}) des protéines de calibration sont déterminés selon la formule :

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

- V_o : volume mort de la colonne (mL) ;
 - V_t : volume total ;
 - V_e : volume d'élution de la protéine.

- **Suivi de la purification**

Après chaque étape de chromatographie, l'activité est recherchée dans les fractions collectées et déterminées à l'aide des techniques de colorations.

H.4. Immobilisation en alginate de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase

Tout d'abord, on prépare une solution d'alginate de sodium en ajoutant 2,3 g pour 100 mL d'eau distillée bouillante sous agitation. L'homogénéisation s'effectue lentement et est accompagnée d'une désaération de la solution pendant 30 min. Lorsque la température est redescendue aux alentours de 40-45 °C, on ajoute l'enzyme toujours sous agitation.

La suspension ainsi réalisée est placée dans une seringue et un goutte à goutte est effectué dans une solution contenant un ion bivalent à 0,05 M maintenue sous agitation à température ambiante, ce qui va permettre la formation des billes. A l'issue de l'écoulement de la suspension, les billes sont laissées sous agitation 30 min, ensuite elles sont rincées à l'eau distillée puis mises à équilibrer dans une solution avec l'ion bivalent à 0,005 M. Les billes sont alors prêtes pour la

bioconversion et conservées à 4 °C. Différents paramètres sont alors testés pour optimiser l'isomérisation des pentoses, tels que :

- l'effet du pourcentage d'alginate de sodium (de 1 à 4%)

- l'influence des ions sur l'inclusion:

La confection des billes et la bioconversion vont être influencées selon l'ion utilisé. L'immobilisation des enzymes a donc été testée avec plusieurs ions bivalents (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{2+}) afin de voir leur influence sur la réticulation avec la matrice d'alginate, mais également l'effet sur l'activité de l'enzyme. Différentes molarités d'ions ont également été réalisées.

- la taille des billes

Afin de tester l'effet de la taille sur la bioconversion, différents types de billes ont été coulés à l'aide d'embouts de tailles plus ou moins grandes afin d'obtenir des billes ayant une taille de 1 à 4 mm.

- l'effet de différents tampons :

La biomasse est suspendue dans différents tampons afin de visualiser l'incidence qu'ils pourraient avoir sur la formation des billes mais également sur l'activité des enzymes.

- la différence entre l'immobilisation de cellules entières et du contenu intracellulaire :

Un cassage cellulaire a été effectué avant inclusion dans les billes d'alginate afin de comparer l'effet de ce cassage sur la bioconversion. Ceci afin d'observer s'il est utile de réaliser des étapes de purification pour augmenter la bioconversion ou si les cellules entières immobilisées suffisent à avoir l'activité maximale.

- Les paramètres physico-chimiques de l'enzyme immobilisée et de différents débits :

L'isomérisation, après inclusion de l'enzyme dans les billes, est réalisée à quatre débits différents : 0,25 mL/min ; 0,5 mL/min ; 1 mL/min ; 2 mL/min. Ces différentes vitesses d'écoulement sont testées sur une gamme de température allant de 30 à 90 °C et pour une gamme de pH allant de 4,0 à 10,0.

Résultats et Discussion : Fermentation lactique

A. Introduction et hypothèse de travail

L'évolution des produits biodégradables et dernièrement des polymères d'acide lactique, tournée vers l'utilisation des produits agricoles, intéresse fortement la région Champagne-Ardenne qui dispose d'un fort potentiel de production en biomasse végétale sous forme de céréales et notamment le blé. Ils représentent aujourd'hui un marché profitable, intégré et international, avec pour principales motivations officielles l'environnement, la sécurité d'approvisionnement et le remplacement des produits fabriqués à partir des ressources fossiles.

Ces dernières années, les applications industrielles à partir de ressources renouvelables telles que les hémicelluloses, qui composent 6-8% de la matière sèche du blé, sont en plein essor. Dans ce cadre, et fort de l'expérience d'A.R.D. sur la valorisation des sucres en C5 issus des céréales, notamment dans la fabrication de sirops de son, la voie de valorisation biotechnologique de ces sucres est envisageable par voie microbiologique.

Dans cette partie les études préliminaires ont permis de cribler différentes bactéries afin de détecter une souche capable de croître sur les pentoses, arabinose et xylose, et de les fermenter en acide lactique.

Par la suite, à l'aide de méthodes statistiques, nous avons cherché à optimiser la fermentation à partir de la bactérie lactique d'intérêt afin d'obtenir le meilleur rendement en acide lactique tout en essayant de limiter la production d'acide acétique à partir des glucides du sirop de son de blé, que ce soit les hexoses (glucose) ou les pentoses. En parallèle, ces optimisations du milieu de culture MRS, doivent nous permettre de diminuer le coût de ce milieu qui est le milieu de base utilisé pour la croissance des lactobacilles. Mais ce dernier présente l'inconvénient de présenter un coût significatif sur la production de l'acide lactique à grande échelle au niveau industriel et au final d'augmenter le prix du produit. Le but de cette optimisation est par conséquent d'une part de réduire les composants du milieu tout en augmentant la production en acide lactique.

De plus, plusieurs types de fermentations ont été réalisés en fin d'expérimentation, tels que la culture en bioréacteur batch en une seule étape ou en culture multi-étagée ou encore grâce à la méthode d'immobilisation cellulaire, afin de rechercher le meilleur procédé donnant la concentration en acide lactique la plus élevée, avec pour chaque méthode de fermentation la même durée de culture.

B. Criblage de bactéries lactiques hétérofermentaires pour la production d'acide lactique à partir des pentoses

Les bactéries lactiques hétérofermentaires ont été commandées à la DSMZ et sont connues comme utilisatrices des pentoses, arabinose ou xylose selon les cas [Bustos *et al.*, 2005].

Les résultats présentés dans le [Tableau 1](#) montrent que ces bactéries lactiques utilisent effectivement les pentoses tels que l'arabinose et le xylose. Cependant, leur utilisation est plus ou moins rapide et élevée, ce qui va donc rendre la production d'acide lactique plus ou moins importante. L'observation des résultats a permis de sélectionner deux souches, *Lactobacillus bif fermentans* et *Lactobacillus pentosus*, qui ont la capacité de métaboliser les deux pentoses testés. Cependant *L. bif fermentans* présente une production d'acide lactique plus intéressante vis-à-vis de l'arabinose pour une même consommation de glucides par rapport à *L. pentosus*. Nous avons donc choisi pour la suite de notre étude de conserver la bactérie lactique *L. bif fermentans* pour réaliser une étude plus approfondie sur la production d'acide lactique à partir du sirop de son de blé, fourni par le groupe A.R.D., et qui est composé principalement de glucose, xylose et arabinose.

Tableau 1 : Criblage des bactéries lactiques hétérofermentaires sur milieu MRS sans glucose à 35 °C, pH 6,8 complétés par de l'arabinose ou du xylose (10 g/L). Les cultures batch sont incubées pendant 24 h.

Isolat	Utilisation pentoses (%)		Production Ac.lactique (g/L)	
	Arabinose	Xylose	Arabinose	Xylose
<i>Lactobacillus pentosus</i>	89	77	2,45	2,37
<i>Lactobacillus plantarum</i>	87	57	2,05	1,16
<i>Lactobacillus bif fermentans</i>	88	76	3,18	2,38
<i>Lactobacillus curvatus</i>	66	60	0,98	0,96
<i>Lactobacillus casei</i>	48	50	1,08	0,19
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	83	62	0,82	0,09

C. Culture de *Lactobacillus bifерmentans* sur sucres simples

La souche *L. bifерmentans*, métabolise les hexoses et les pentoses afin de produire de l'acide lactique comme nous avons pu le constater. Cependant, des différences dans l'utilisation de ces substrats peuvent exister, notamment pour les pentoses qui s'avèrent en général plus difficilement utilisable.

C.1. Culture sur glucides simples

Nous avons tout d'abord réalisé une étude de la fermentation de *L. bifерmentans* sur les glucides simples retrouvés dans le sirop de son, afin de déterminer les productions d'acide lactique en fonction du substrat, mais également si des différences de comportement vis-à-vis de ces substrats pouvaient être observées tels que la croissance cellulaire et la vitesse de consommation des glucides.

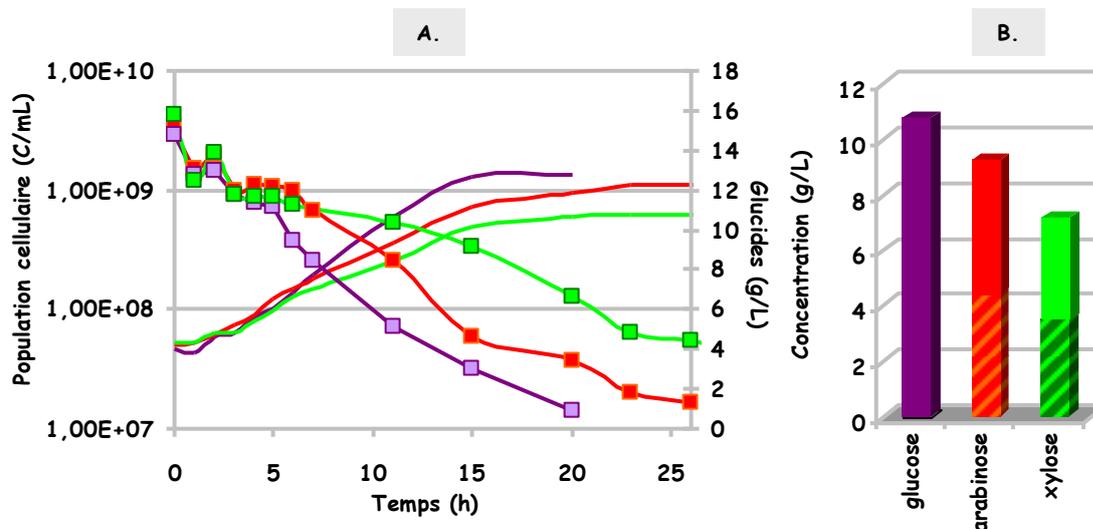


Figure 1 : Culture de *L.bifерmentans* en fonction du substrat (15 g/L) : glucose (■), xylose (■) et arabinose (■) sur milieu MRS (à 35 °C et pH = 7,3). **A** - Suivi de fermentation : (—) Population - (■) consommation glucides. **B** - Production d'acide lactique (plein) et d'acide acétique (hachuré) au bout de 25 h de cultures.

Lors de ces cultures, nous observons que *L. bifерmentans* a la capacité de consommer les 3 glucides [Figure 1]. Cependant, elle métabolise plus difficilement les pentoses par rapport au glucose, mais également le xylose par rapport à l'arabinose. En effet, *L. bifерmentans* présente une meilleure croissance sur glucose que sur pentoses et présente une consommation plus rapide

du glucose avec un épuisement total de ce dernier au bout de 20 h de culture. En ce qui concerne les pentoses, au bout de 25 h il reste encore 4 g/L de xylose tandis que l'arabinose est pratiquement épuisé.

Ces différences de culture sont dues au fait que cette souche utilise la voie lactique homofermentaire lors de la consommation du glucose et la voie lactique hétérofermentaire lors de la consommation des pentoses [Bustos *et al.*, 2005 ; Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000]. De plus, la conversion du xylose en ribulose dans cette voie s'effectue en deux étapes tandis qu'une seule étape est nécessaire pour l'arabinose, expliquant ainsi les différences observées entre ces deux glucides. Enfin, on remarque que sur glucose *L. bifementans* ne produit que de l'acide lactique, alors que sur pentoses on retrouve de l'acide lactique avec de l'acide acétique, confirmant ainsi nos hypothèses.

C.2. Effet de différents ions

Les voies métaboliques des souches, et plus particulièrement les enzymes, nécessitent en général la présence de cofacteurs tels que les ions. Cependant, les besoins en ions de ces bactéries lactiques diffèrent selon l'espèce [van Niel et Hahn-Hägerdal, 1999]. Ainsi, nous avons testé l'effet de différents ions sur la consommation du xylose et de l'arabinose [Tableau 2].

En présence d'ion Mn^{2+} *L. bifementans* présente le meilleur taux de croissance ainsi que la meilleure consommation des pentoses. Ohkouchi et Inoue [2006] ont déterminé chez *L. manihotivorans* que le milieu MRS déficient en $MnSO_4$ présentait une production en acide lactique plus faible qu'avec un milieu complété en manganèse. De plus il est connu que l'ion manganèse protège les lactobacilles en condition micro-aérophile contre des produits réactifs de l'oxygène tels que l'anion superoxide (O_2^-) ou le peroxide d'hydrogène [Archibald et Fridovich, 1981a,b]. Dans un second temps, nous avons donc testé différentes molarités et l'effet optimal est obtenu pour une molarité de 2,5 mM, car les cultures avec 0,5 et 1 mM ont une consommation en sucre, un taux de croissance et un temps de génération plus faible. Au contraire, une concentration plus importante de Mn^{2+} ne permet pas d'améliorer nos rendements, mais au contraire une diminution et deviendrait par conséquent néfaste à la souche tout en permettant tout de même une amélioration des rendements vis-à-vis des autres ions Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} et Zn^{2+} .

Tableau 2 : Effet de différents ions sur la culture de *Lactobacillus bifementans* en fonction du substrat : **A** - xylose et **B** - arabinose (culture à 10 g/L dans du MRS, à 35 °C et pH 7,0 en condition micro-aérophile).

A.

Ions	mM	Croissance (C/mL)	μ (min ⁻¹)	g (min)	Biomasse (g/L)	Y (g cell./g sucres)	S.R. conso. (g/L)	% Xyl. consommé
FeCl ₂	2,5	2,65E+09	0,0017	396,1	0,52	0,1	5,21	62,15
CaCl ₂		2,22E+09	0,0025	280,6	0,46	0,09	5,38	63,17
ZnCl ₂		1,77E+09	0,0019	363,4	0,42	0,08	5,19	59,36
CoCl ₂		2,52E+09	0,0028	246,4	0,49	0,09	5,28	60,45
MgSO ₄		2,30E+09	0,0025	280,1	0,47	0,09	5,13	67,26
CuSO ₄		1,79E+09	0,0019	359,6	0,42	0,13	3,33	38,86
MnSO ₄	0,5	2,33E+09	0,0032	219,8	0,48	0,06	7,87	78,26
	1	2,35E+09	0,0033	207,7	0,48	0,05	8,9	79,67
	2,5	2,39E+09	0,0037	188,7	0,48	0,05	9,26	82,74
	5	2,31E+09	0,0038	182,8	0,47	0,05	8,89	79,36

B.

Ions	mM	Croissance (C/mL)	μ (min ⁻¹)	g (min)	Biomasse (g/L)	Y (g cell./g sucres)	S.R. conso. (g/L)	% Ara. consommé
FeCl ₂	2,5	2,13E+09	0,0022	309	0,45	0,07	6,7	85,95
CaCl ₂		1,72E+09	0,005	138,9	0,41	0,06	6,36	88,47
ZnCl ₂		1,48E+09	0,0024	287,9	0,39	0,06	6,26	83,66
CoCl ₂		1,43E+09	0,0039	179,2	0,38	0,05	7,15	83,91
MgSO ₄		1,98E+09	0,0041	167,6	0,43	0,06	6,77	89,79
CuSO ₄		1,15E+09	0,003	234	0,36	0,07	5,09	66,58
MnSO ₄	0,5	2,39E+09	0,0064	109	0,48	0,06	8,35	90,06
	1	2,40E+09	0,0064	108,5	0,48	0,05	8,83	89,37
	2,5	2,43E+09	0,0079	88,2	0,48	0,05	8,88	90,33
	5	2,35E+09	0,0059	117,5	0,47	0,05	8,71	88,16

Pour la suite de notre étude nous avons donc décidé de conserver l'ion Mn²⁺ à une molarité de 2,5 mM et de supprimer l'ion Mg²⁺ qui est normalement ajouté au milieu MRS.

D. Optimisation de la culture de *Lactobacillus bifementans* sur sirop de son de blé afin de produire de l'acide lactique

Dans cette partie nous avons décidé d'appliquer la méthode des plans d'expérience afin de réduire le nombre d'essais à réaliser pour améliorer les conditions de fermentation, tout en augmentant la production d'acide lactique et le rendement.

D.1. Étude de l'impact des composants du milieu MRS

Lors des fermentations microbiennes, le coût du milieu peut être réduit de presque 30% [Miller et Churchill, 1986], par conséquent nos travaux se sont portés sur l'effet des composants du milieu MRS et leurs interactions sur la production d'acide lactique.

D.1.1. Effet des différents composants du milieu MRS

- Matrice des essais et résultats

Tableau 3 : Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Pep. (g/L)	Y.E. (g/L)	M.E. (g/L)	P. (g/L)	Cit. (g/L)	NH ₄ (g/L)	Population (C/mL)	% sucres conso.	Ac.lact. (g/L)	Y (g ac.lact. /g sucres)
1	17,5	1,25	2,5	3,5	8,75	0,5	2,87E+09	32,6	1,72	0,12
2	17,5	8,75	17,5	0,5	1,25	0,5	3,27E+09	18,6	2,08	0,27
3	2,5	1,25	2,5	0,5	1,25	0,5	1,94E+09	10,4	1,21	0,31
4	17,5	1,25	17,5	0,5	8,75	0,5	3,08E+09	27,4	1,68	0,14
5	17,5	1,25	17,5	3,5	1,25	3,5	2,69E+09	25,6	2,12	0,23
6	17,5	8,75	2,5	3,5	1,25	0,5	3,12E+09	26	4,59	0,46
7	2,5	8,75	2,5	3,5	1,25	3,5	2,95E+09	20,6	6,38	0,72
8	2,5	8,75	2,5	0,5	8,75	0,5	3,38E+09	20,7	7,58	0,92
9	2,5	1,25	17,5	3,5	1,25	0,5	2,54E+09	19,1	5,67	0,69
10	17,5	8,75	2,5	0,5	8,75	3,5	3,51E+09	31,2	6,82	0,56
11	2,5	1,25	2,5	3,5	8,75	3,5	2,91E+09	25,6	6,07	0,57
12	2,5	1,25	17,5	0,5	8,75	3,5	3,19E+09	26,5	7,18	0,67
13	2,5	8,75	17,5	3,5	8,75	0,5	3,64E+09	30,1	5,95	0,5
14	17,5	1,25	2,5	0,5	1,25	3,5	2,23E+09	19	4,55	0,57
15	2,5	8,75	17,5	0,5	1,25	3,5	2,87E+09	16,7	6,22	0,99
16	17,5	8,75	17,5	3,5	8,75	3,5	4,15E+09	26,7	10,25	1,02
17	10	5	10	2	5	2	3,26E+09	22,2	8,73	1
18	10	5	10	2	5	2	3,08E+09	25,8	10,21	0,96
19	10	5	10	2	5	2	3,11E+09	19,8	9,53	1,23
20	10	5	10	2	5	2	3,11E+09	25,4	8,89	0,92

Afin de pouvoir étudier les 6 composants majoritaires du milieu et leurs interactions, nous avons réalisé un plan d'expérience à 6 facteurs et 2 niveaux selon un modèle Plackett et Burman [Tableau 3]. Ce type d'analyse a pour objectif de distinguer le rôle de chacun des éléments afin de retenir les principaux effets pour une étude plus approfondie.

▪ **Impact des différents facteurs**

L'impact de six facteurs, la peptone de caséine, l'extrait de levure, l'extrait de viande, le sulfate d'ammonium, le citrate de sodium, et le phosphate dipotassique, a été évalué. Le Tween 80 a été directement préservé pour examiner son effet sur la production d'acide lactique dans les études suivantes.

La réponse pour la production d'acide lactique a montré une grande hétérogénéité des résultats, qui prouve l'importance de l'impact de certains facteurs moyens. En effet, la production d'acide lactique a changé clairement avec divers niveaux des composants moyens dans une gamme de 1,21 à 10,25 g/L [Tableau 3]. Cette variation reflète l'importance de l'optimisation pour atteindre une production plus élevée.

Tableau 4 : Résultats de l'analyse de Plackett et Burmann pour la production d'acide lactique.

Composants	Effets	Erreur standard	Valeur-t	Valeur-P	Confidence (%)
Peptone	0,902	0,091	9,944	0,002	99,78
Extrait de levure	1,229	0,091	13,556	0,001	99,91
Extrait de viande	-0,778	0,091	-8,580	0,333	66,72
Phosphate dipotassique	0,139	0,091	1,537	0,222	77,81
Citrate de Sodium	0,339	0,091	3,742	0,033	96,67
Sulfate d'Ammonium	1,194	0,091	13,170	0,001	99,91

Quatre variables que sont l'extrait de levure, la peptone de caséine, le citrate de sodium, le sulfate d'ammonium, sur 6 variables du milieu MRS se sont démontrées significatives avec un coefficient de confiance supérieur à 95% [Tableau 4] impliquant que ces variables ont influencé le procédé de fermentation pour la production d'acide lactique. Les variables restantes, l'extrait de viande et le phosphate dipotassique, se sont avérées insignifiantes sur cette même production.

D.1.2. Optimisation et formulation du milieu de croissance du fermenteur

Après avoir étudié les effets des différents composants, nous avons précisé notre étude sur les principaux facteurs ayant un effet significatif et sur leurs interactions afin de confirmer les interprétations précédentes et ainsi optimiser la réponse.

▪ **Effet de l'interaction entre citrate de sodium (x5) et sulfate d'ammonium (x6)**

L'effet positif simple de ces deux composants apparaît important, et leurs associations auraient sans doute un effet maximal sur la production d'acide lactique. Nous avons donc entrepris une étude de cette interaction à l'aide d'un plan d'expérience à 2 facteurs et 3 niveaux [Tableau 5].

Tableau 5 : Matrice et réponses du plan d'optimisation de la production d'acide lactique : effet du citrate de sodium et du sulfate d'ammonium [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Bloc	Cit. (g/L)	NH ₄ (g/L)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	1	0	0	34,01	8,30	0,76
2	2	2,5	1	40,38	10,87	0,84
3	1	0	0,5	31,75	8,06	0,80
4	2	2,5	2	37,25	9,48	0,77
5	1	0	1	30,59	8,39	0,87
6	2	2,5	3	34,82	9,83	0,87
7	1	1,25	0	29,27	7,64	0,83
8	2	5	1	36,75	9,37	0,80
9	1	1,25	0,5	34,29	9,37	0,88
10	2	5	2	39,76	10,28	0,80
11	1	1,25	0,5	33,77	7,94	0,74
12	2	5	2	44,87	8,68	0,58
13	1	1,25	1	32,44	9,15	0,90
14	2	5	3	38,94	9,99	0,79
15	1	2,5	0	35,75	9,49	0,83
16	2	7,5	1	39,80	10,96	0,85
17	1	2,5	0,5	37,48	8,86	0,71
18	2	7,5	2	39,87	9,69	0,78
19	1	2,5	1	36,19	9,94	0,87
20	2	7,5	3	42,26	11,05	0,78

Cette étude a été réalisée en deux parties de 10 essais, bloc 1 et bloc 2. De même, des essais de reproductibilité ont été réalisés (essais 9 à 12). L'expression mathématique caractérisant

l'interaction entre le citrate de sodium et le sulfate d'ammonium sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé est la suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 14,086 - 1,15 x - 3,22 y + 0,17 x^2 + 0,114 xy + 0,7084 y^2$$

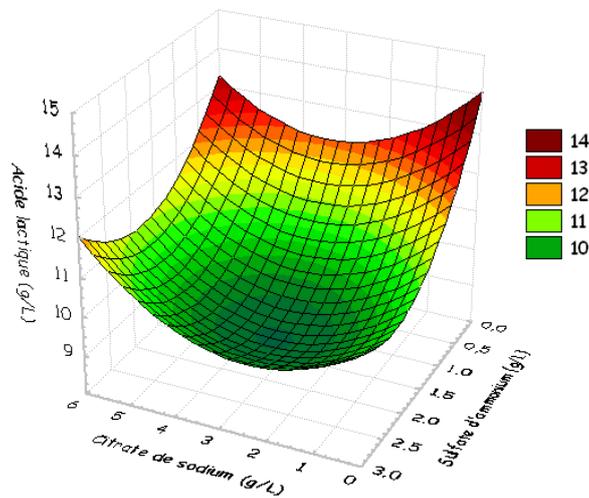


Figure 2 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du citrate de sodium (x5) et du sulfate d'ammonium (x6) [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

D'après les résultats obtenus [Figure 2](#), l'interaction entre x5x6 entraîne au contraire une annulation des effets positifs de ces facteurs. L'effet est optimal que lorsqu'un des deux composants est augmenté et l'autre diminué par rapport au milieu de base MRS. En outre, comme nous le constatons dans la matrice, les meilleures productions d'acide, corrélées à une meilleure consommation, sont obtenues lorsqu'il existe un facteur de 2,5 entre la concentration de x6 et de x5 (essai 2, 10 et 20). Cependant, les meilleurs rendements sont obtenus lorsqu'il existe peu de différences entre les concentrations de ces deux facteurs.

Une production optimale d'acide pourrait donc être obtenue avec un apport de 7,5 g/L de citrate de sodium et avec 3 g/L de sulfate d'ammonium. Cependant, l'apport de citrate de sodium au milieu pourrait s'avérer moins intéressant lors d'une culture où le pH serait maintenu puisque l'effet positif de ce facteur sur la production d'acide pourrait être dû à son pouvoir tampon. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons donc effectué une comparaison de fermentation avec maintien du pH entre un milieu MRS avec du citrate de sodium et un autre sans. Nous observons que la souche présente des conditions similaires de croissance et de consommations en glucides entre les deux milieux [\[Figure 3\]](#).

Cependant une amélioration de la production d'acide lactique de 4,65 g/L, ainsi qu'un meilleur rendement acide lactique/sucres consommés et une diminution de la production d'acide acétique de 3,02 g/L apparaissent avec le milieu modifié, permettant ainsi de confirmer notre hypothèse que dans le cas d'un maintien du pH, l'apport de citrate de sodium n'est pas utile voir même diminue les rendements en acide lactique.

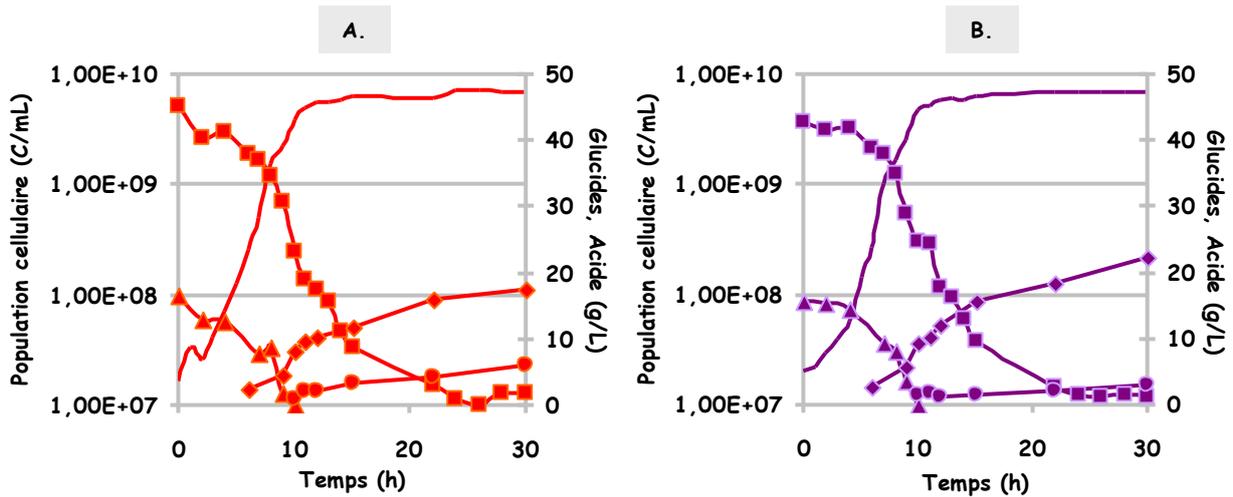


Figure 3 : Comparaison des cinétiques de fermentation entre le milieu MRS optimisé **A** - avec citrate de sodium ou **B** - sans citrate de sodium pour *L. bif fermentans*. (—) Population - (■) Consommation glucides - (▲) Glucose - (◆) Acide lactique - (●) Acide acétique.

▪ **Effet de l'interaction entre le Tween 80 et le phosphate d'ammonium**

Au vu des résultats obtenus dans les études précédentes nous avons décidé de réaliser un plan d'expérience sur le composant Tween 80 qui permettrait d'augmenter le transfert des glucides à travers la membrane cellulaire et ainsi permettrait d'augmenter la production d'acide lactique et d'enzymes [Naveena *et al.*, 2005]. Cependant, Chauhan *et al.* [2005] ont également trouvé un effet significatif sur la production d'acide lactique, mais qui est négatif. Ceci pourrait être dû au fait que la souche a eu facilement les sucres réducteurs disponibles. Au niveau de cette étude, nous avons choisi d'utiliser le phosphate d'ammonium à la place du sulfate d'ammonium et du phosphate dipotassique, dans le but de réduire les coûts [Nancib *et al.*, 2005]. Nous avons donc entrepris une étude de cette interaction à l'aide d'un plan d'expérience à 2 facteurs et 3 niveaux [Tableau 6].

Tableau 6 : Matrice et réponses du plan d'optimisation de la production d'acide lactique : effet du Tween 80 et du phosphate d'ammonium [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Tween 80 (g/L)	NH ₄ PO ₄ (g/L)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	0	2	53,3	6,01	0,56
2	0	5	59,5	6,90	0,58
3	0	8	59,7	7,48	0,63
4	1	2	62,2	8,18	0,66
5	1	5	58,9	8,85	0,75
6	1	5	61,2	8,22	0,67
7	1	8	59,5	6,43	0,54
8	2	2	59,3	7,38	0,62
9	2	5	60,1	6,36	0,53
10	2	8	60,1	6,84	0,57

L'expression mathématique caractérisant l'interaction entre le Tween 80 et le phosphate d'ammonium sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé est la suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 5,429 + 2,933 x + 0,521 y - 1,031 x^2 - 0,168 xy - 0,04 y^2$$

Le plan d'expérience nous montre que le Tween 80 a un effet positif sur la production d'acide lactique avec un optimum entre 0,8 et 1,3 g/L mais si l'on ajoute des concentrations plus élevées de Tween dans le milieu on trouve un effet négatif sur cette même production.

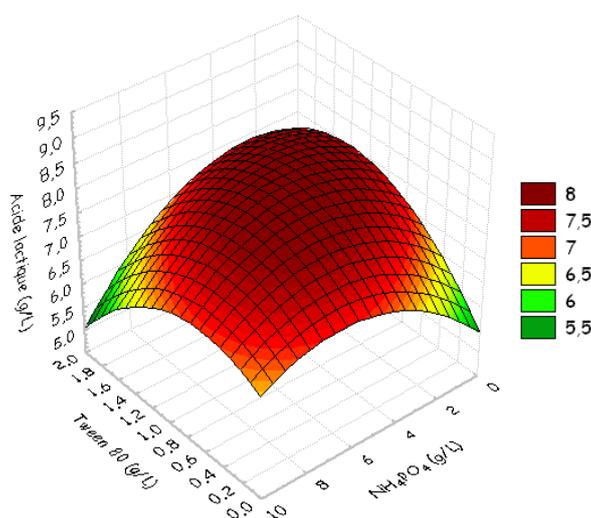


Figure 4 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du Tween 80 et du phosphate d'ammonium [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

De même, le phosphate d'ammonium permet d'augmenter la production pour une concentration comprise entre 2 et 6 g/L. On constate également que le remplacement du sulfate d'ammonium et

du phosphate dipotassique par le phosphate d'ammonium ne présente de différences significatives pour la croissance cellulaire et la production d'acide lactique. Pour confirmer, cette dernière observation nous avons réalisé la comparaison des fermentations sur milieu optimisé avec sulfate d'ammonium et phosphate dipotassique et sur milieu optimisé avec du phosphate d'ammonium [Figure 5].

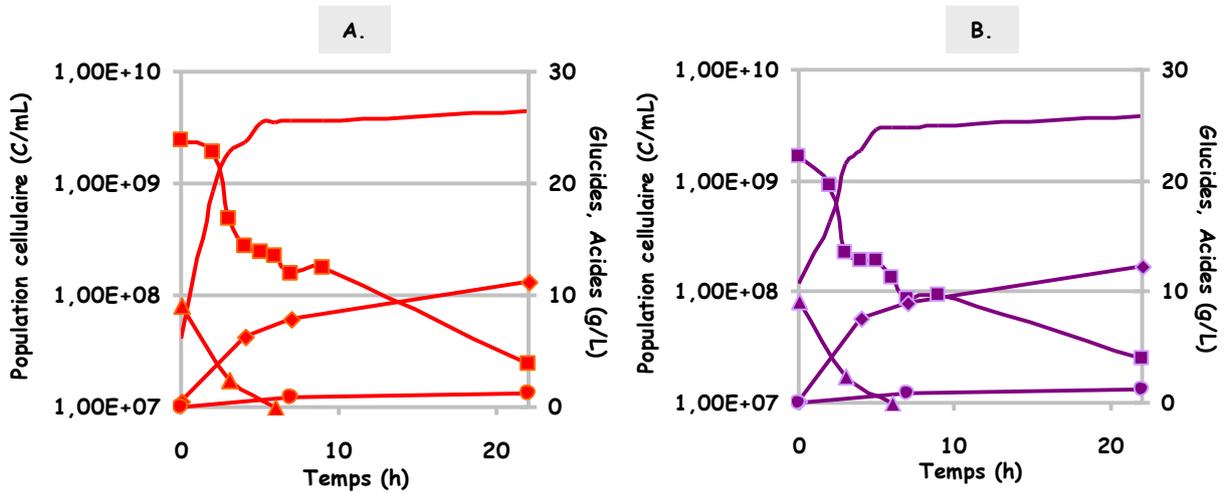


Figure 5 : Comparaison des cinétiques de fermentation entre différents milieux MRS pour *L. bif fermentans*. **A** - avec sulfate d'ammonium et phosphate dipotassique et **B** - avec phosphate d'ammonium. Consommation des glucides et de production d'acides. (—) Population - (■) Consommation glucides - (▲) Glucose - (◆) Acide lactique - (●) Acide acétique.

La comparaison des deux fermenteurs nous montre un profil de culture et de production d'acide lactique similaire et par conséquent confirme les observations réalisées ci-dessus sur le phosphate d'ammonium.

▪ **Effet de l'interaction entre la peptone (x1), l'extrait de levure (x2) et le phosphate d'ammonium (x4)**

La recherche sur le développement d'un procédé efficace et économique pour la production d'acide lactique doit se porter vers les sources d'azote en vue du remplacement des ingrédients coûteux comme l'extrait de viande et de levure [Altaf *et al.*, 2005-2006]. Sachant que ces sources d'azotes sont utilisées en tant que supplément d'azote peptidique et de facteurs de croissance (vitamines de B) qui ont un effet significatif sur la production d'acide lactique et ne peuvent donc être que difficilement enlevées de la constitution du milieu de culture [Selmer-Olsen et Sorhaug, 1998 ; Aeschlimann et Von Stockar, 1990]. Dans une analyse

économique sur la fermentation lactique, le composant présentant un rôle majeur s'est avéré être l'extrait de levure, mais qui représente également environ 38% du coût moyen de la fermentation [Teleyady et Cheyran, 1995]. Pour l'étude de ces 3 paramètres, nous avons réalisé un plan composite centré (CCC) de 18 essais [Tableau 7].

Tableau 7 : Matrice et réponses de l'effet de la concentration en extrait de viande, extrait de levure et phosphate d'ammonium [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Peptone (g/L)	Y.E. (g/L)	NH ₄ PO ₄ (g/L)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	2,5	1,25	1	36,9	7,38	0,63
2	12,5	1,25	1	38,1	8,81	0,69
3	2,5	6,25	1	35,6	9,33	0,76
4	12,5	6,25	1	47,3	8,08	0,49
5	2,5	1,25	5	39,4	8,65	0,67
6	12,5	1,25	5	42,9	9,15	0,61
7	2,5	6,25	5	45,1	9,50	0,62
8	12,5	6,25	5	36,1	8,94	0,76
9	0	3,75	3	32,6	6,12	0,57
10	15	3,75	3	44,1	9,13	0,57
11	7,5	0	3	38,2	9,50	0,74
12	7,5	7,5	3	46	9,54	0,57
13	7,5	3,75	0	38,1	9,37	0,74
14	7,5	3,75	6	37,6	7,60	0,60
15	7,5	3,75	3	37,3	10,05	0,81
16	7,5	3,75	3	41,8	8,26	0,56
17	7,5	3,75	3	41,2	9,87	0,71
18	7,5	3,75	3	42,8	8,69	0,58

Les expressions mathématiques caractérisant l'interaction entre ces paramètres sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé sont les suivantes :

$$(A) \text{ Ac. lactique (g/L)} = 6,8792 + 0,444 x + 0,351 y - 0,024 x^2 - 0,0029 xy - 0,0549 y^2$$

$$(B) \text{ Ac. lactique (g/L)} = 8,619 - 0,261 x + 0,285 y + 0,0488 x^2 - 0,0144 xy - 0,0386 y^2$$

$$(C) \text{ Ac. lactique (g/L)} = 6,489 + 0,554 x + 0,0108 y - 0,0227 x^2 - 0,0373 xy + 0,044 y^2$$

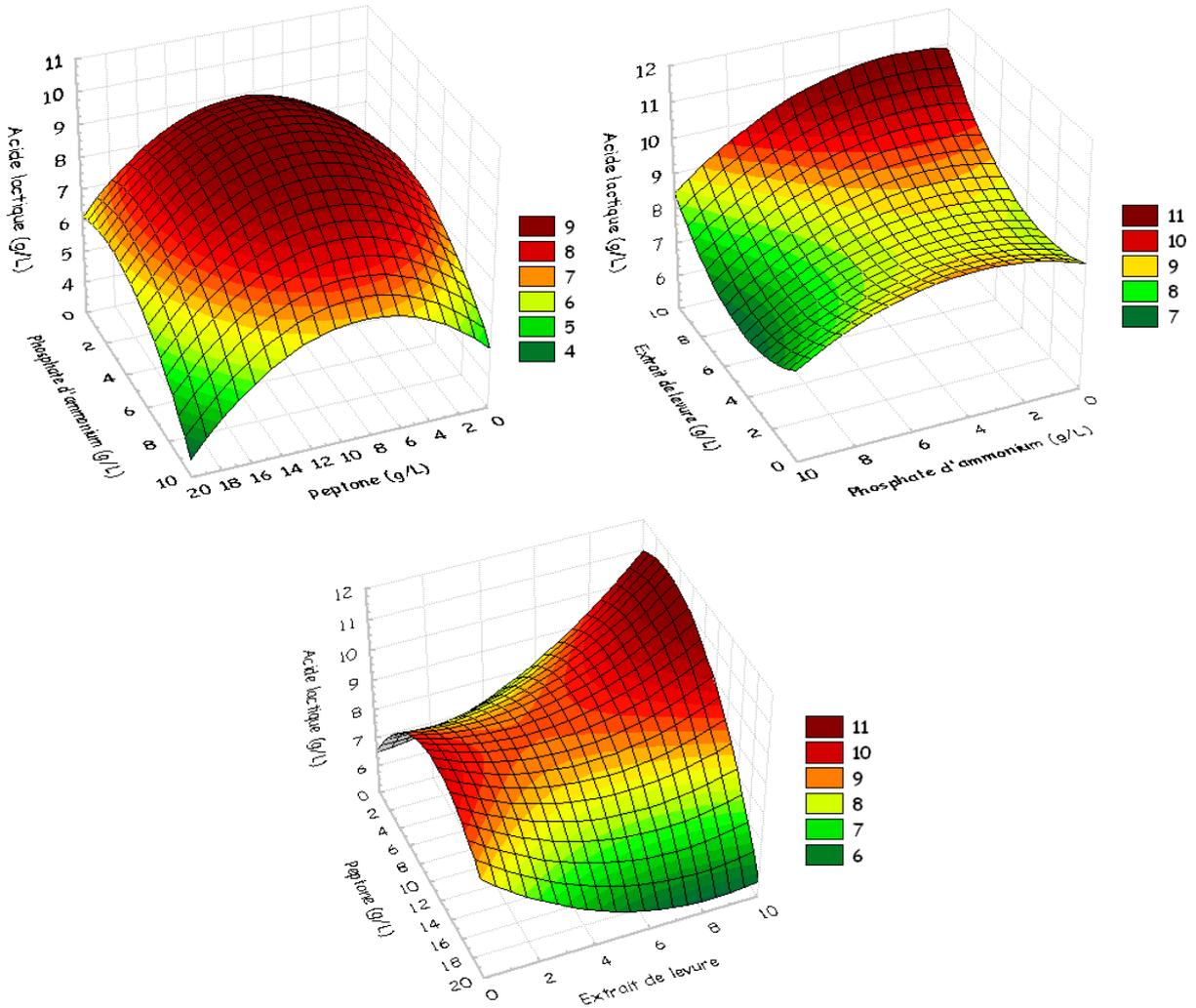


Figure 6 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de La peptone (x1), l'extrait de levure (x2) et le phosphate d'ammonium (x4) [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Les résultats obtenus démontrent que l'extrait de levure apparaît effectivement comme un élément indispensable à la production d'acide lactique et que cette augmentation est proportionnelle à l'augmentation de la concentration en extrait de levure comme dans le cas des études de Chiarini *et al.* [1992] et Yoo *et al.* [1997]. Kadam *et al.* [2005] ont trouvé que la production d'acide lactique est maximale pour une concentration de 10 g/L pour la souche *L. delbrueckii*, ce que l'on observe également pour notre souche. Par contre, l'optimisation des deux composants que sont l'extrait de levure et le phosphate d'ammonium permettent de diminuer de façon intéressante la concentration en extrait de viande. Cependant, ce dernier composant ne peut être supprimé totalement en effet quand il n'est pas ajouté au milieu la production d'acide lactique chute fortement ainsi que la croissance cellulaire.

D.2. Effet des différents paramètres de culture

Suite à ces résultats et afin de ne négliger aucun paramètre pouvant affecter la production d'acide lactique lors des fermentations, nous décidons d'étudier chacun d'entre eux à l'aide de plan d'expérience à 2 facteurs et 3 niveaux.

D.2.1. Température et pH

Une étude des conditions de pH et de température a été réalisée afin de déterminer les conditions permettant la meilleure production d'acide lactique à partir du sirop de son de blé [Tableau 8]. L'étude a été réalisée à l'aide d'un plan d'expérience à 2 facteurs et 3 niveaux de 10 essais. Afin de confirmer la validité du modèle, des essais de reproductibilité ont aussi été réalisés (essai 5 et 6).

Tableau 8 : Matrice et réponses de l'effet de la température et du pH [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	T°C	pH	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	32	6,5	51,99	12,92	0,66
2	32	7,0	57,63	17,97	0,82
3	32	7,5	63,09	16,26	0,68
4	35	6,5	52,57	17,50	0,88
5	35	7,0	58,11	19,80	0,90
6	35	7,0	56,93	19,62	0,91
7	35	7,5	57,79	17,24	0,79
8	37	6,5	63,30	17,60	0,74
9	37	7,0	46,53	15,72	0,89
10	37	7,5	51,65	18,84	0,97

L'expression mathématique caractérisant l'effet de la température et du pH sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé est la suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 120,09 - 4,64 x - 7,82 y + 0,0012 x^2 + 0,619 xy - 0,89 y^2$$

D'après les résultats obtenus [Figure 7], nous constatons que le pH et la température ont tous les deux un effet sur la production d'acide lactique. En effet, une bonne production est obtenue lorsqu'une augmentation de la température suit une augmentation du pH, et cela à partir de 32 °C et pH 6,5. En revanche, la production d'acide semble être moins bonne lorsque nous avons des

températures plus élevées (37 °C) couplées à un pH acide (6,5) ou quand nous avons des températures trop basses (32 °C) couplées à un pH basique (7,5). Une production optimale est atteinte avec une température de 37 °C et un pH de 7,5.

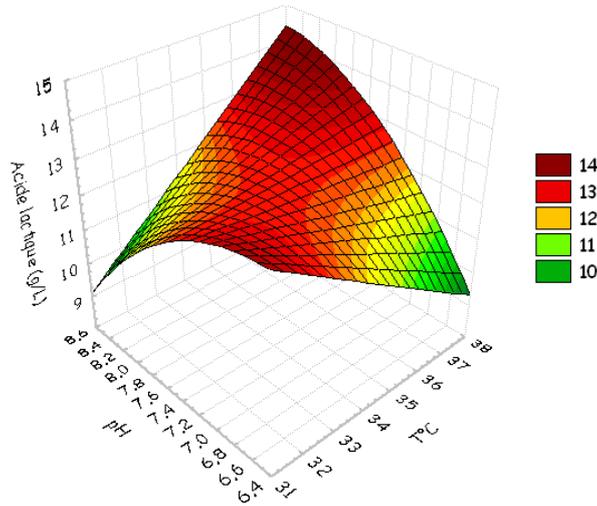


Figure 7 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction du pH et de la température [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Cependant au niveau de la matrice d'expérience, nous constatons une meilleure production à 35 °C et pH 7,0 mais avec un rendement plus faible. De plus, ces conditions sont similaires à celles obtenues sur culture des pentoses (données non présentées). Il est donc possible que les changements métaboliques entre la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et la voie des pentoses phosphate interviennent avant que l'acide ne soit excrété par la souche et donc avant que le pH ne chute. Ces conditions permettraient ainsi une meilleure mise en place du métabolisme, mais aucune donnée ne nous permet d'étayer cette hypothèse.

Nous observons également que le meilleur rendement est obtenu à 37 °C et pH 7,5, avec une plus faible consommation du sirop de son et de la production d'acide lactique. Cette température correspond aux conditions optimales de fermentation des hexoses (données non présentées). Elle permet donc une meilleure utilisation du glucose, expliquant ainsi le très bon rendement obtenu. En outre, la plus faible consommation et production d'acide pourrait être expliquée par une moins bonne utilisation des pentoses. Lors d'une culture en gros volume, il pourrait donc être intéressant de maintenir les conditions à 37 °C et pH 7,5 pour l'utilisation du glucose et de passer à 35 °C et pH 7,0 lors de l'utilisation des pentoses afin de permettre une production

d'acide optimale. Des expériences supplémentaires seraient à réaliser afin d'étudier le comportement de la souche dans ces conditions et ainsi vérifier cette hypothèse.

D.2.2. L'agitation, la taille et l'âge de l'inoculum

Lors des fermentations, l'accessibilité de la souche au substrat peut être un facteur déterminant dans sa consommation et donc dans la production d'acide lactique, c'est pourquoi nous avons décidé d'étudier l'effet de l'agitation sur la souche. De plus, la taille de l'inoculum et son âge pourraient également intervenir dans cette production. Un plan d'expérience à 3 facteurs et 3 niveaux a donc été établi afin de permettre cette étude. Des essais de reproductibilité du modèle ont encore été réalisés (essais 15 et 16).

Tableau 9 : Matrice et réponses de l'effet de l'inoculum, de son âge et de l'agitation [voir [Matériel et Méthodes, E.4.](#)].

Essais	Inoculum (C/mL)	Agitation (rpm)	Age (jours)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	1,00E+06	0	1	22,08	5,97	0,89
2	1,00E+08	0	1	42,76	9,05	0,68
3	1,00E+06	120	1	23,61	6,98	0,95
4	1,00E+08	120	1	44,77	7,45	0,54
5	1,00E+06	0	7	22,62	6,25	0,88
6	1,00E+08	0	7	32,12	7,63	0,81
7	1,00E+06	120	7	20,59	6,41	1,02
8	1,00E+08	120	7	35,46	7,54	0,67
9	1,00E+06	60	4	21,90	7,01	1,03
10	1,00E+08	60	4	43,40	9,29	0,70
11	1,00E+07	0	4	31,95	8,23	0,83
12	1,00E+07	120	4	30,87	6,55	0,69
13	1,00E+07	60	1	29,77	7,75	0,86
14	1,00E+07	60	7	26,46	7,29	0,89
15	1,00E+07	60	4	29,44	8,26	0,90
16	1,00E+07	60	4	35,68	8,56	0,70

L'expression mathématique caractérisant l'effet de l'agitation et de la taille de l'inoculum sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé est la suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 6,30 + 1,11\text{E-}7 x + 0,026 y - 8,97\text{E-}16 x^2 - 6,85\text{E-}11 xy - 0,0002 y^2$$

La modélisation obtenue [Figure 8](#) montre que l'agitation de la culture n'a pas un effet significatif sur la production d'acide lactique. Cependant, il apparaît avec les résultats présentés dans la matrice qu'une agitation plus importante favorise une production d'acide lactique plus élevée. Malgré cela, elle présente des rendements moins bons lorsque la taille de l'inoculum est trop importante, laissant supposer qu'une agitation modérée serait idéale pour la production puisqu'elle permettrait à la fois d'obtenir une production d'acide intéressante avec des rendements plus importants (0,90 g/g au lieu de 0,70 g/g).

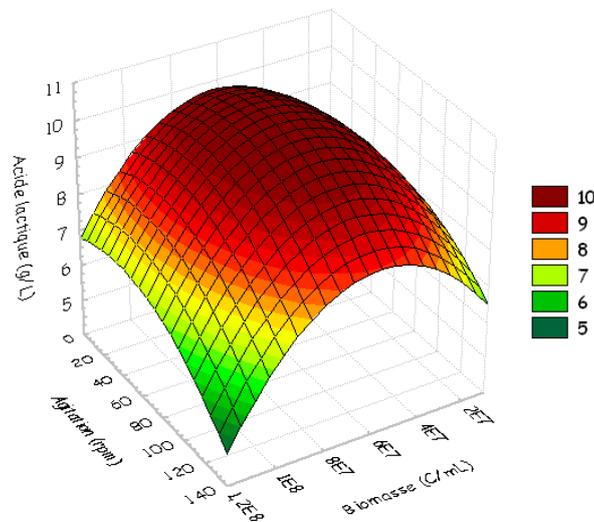


Figure 8 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de l'agitation et de la taille de l'inoculum [\[voir Matériel et Méthodes, E.4.\]](#).

Au contraire, la taille de l'inoculum joue un rôle plus important dans la production d'acide. Malgré une bonne production d'acide, les rendements trop faibles (inférieur à 0,80 g/g) ne permettent pas de retenir 1.10^8 C/mL comme étant une bonne taille d'inoculum. Afin de permettre une optimisation de la production, il est intéressant de débiter la culture avec un inoculum de 1.10^7 C/mL, car cela permet à la fois une bonne production avec de très bons rendements, rejoignant l'interprétation réalisée sur l'effet de l'agitation.

L'expression mathématique caractérisant l'effet de la taille de l'inoculum et de son âge sur la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé est la suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 5,87 + 1,16E-7 x + 0,593 y - 9,48E-16 x^2 - 7,34E-10 xy - 0,079 y^2$$

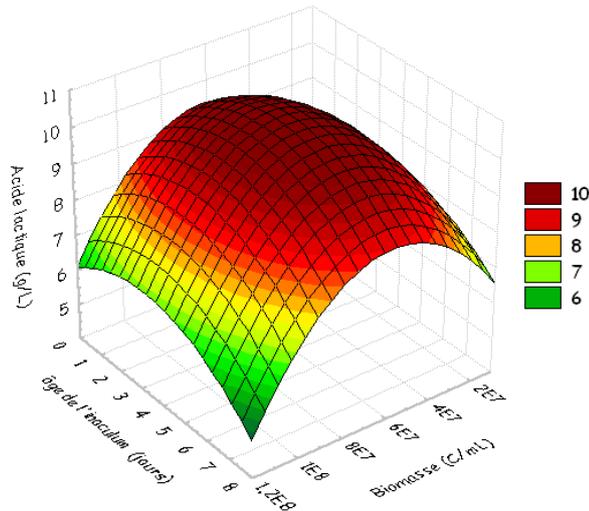


Figure 9 : Surface de réponses de la production d'acide lactique en fonction de la taille de l'inoculum et de son âge [voir [Matériel et Méthodes, E.4.](#)].

Les résultats modélisés ci-dessus sont similaires aux précédents concernant la taille de l'inoculum. En revanche, l'âge de l'inoculum apparaît avoir un effet peu déterminant lors de la production d'acide sur cette modélisation. La matrice d'expérience nous permet cependant d'avancer qu'une souche trop jeune ne favorise pas un bon rendement. En outre, une meilleure production est obtenue avec une souche vieille de 48 h.

D.3. Fermentations sur milieu modifié et conclusion

Pour finir nous avons réalisé une fermentation liquide en réacteur batch à partir du milieu modifié et dans les conditions de culture déterminées précédemment. Pour cela nous avons complété le milieu avec du sirop de son de blé pour une concentration d'environ 120 g/L. L'inoculum a été effectué après deux repiquages successifs en augmentant de volumes au fur et à mesure sur le même milieu et pour une biomasse cellulaire initiale de 1.10^7 C/mL. Des essais ont été réalisés à partir d'un inoculum plus âgé de 3 à 4 jours puisque nous avons démontré précédemment que cela permettait d'augmenter le rendement en acide lactique, cependant pour des concentrations plus élevées la souche présente une phase de latence d'environ 10 à 12 h, ce qui est trop long pour présenter un intérêt. La première partie de la fermentation a été réalisée à 37 °C et pH 7,5 qui sont les conditions optimales pour la consommation du glucose et après épuisement de ce dernier nous avons ajusté la température à 35 °C et pH 7,0 pour la

consommation des pentoses. Lors de cette fermentation, le pH a été maintenu constamment à l'aide de NaOH à 10 N.

Les résultats obtenus montrent que la *L. bif fermentans* se développe immédiatement sans phase de latence et utilise le glucose très rapidement en 5 h de culture. Ensuite elle consomme l'arabinose sans réaliser de diauxie ou très faible au niveau de la population entre 4 h 30 et 5 h. L'arabinose est lui consommé en 13 h de culture. Après épuisement de ces deux sucres, *L. bif fermentans* montre des difficultés à consommer le xylose restant avec seulement 25 g consommé en 35 h de cultures. Nous avons donc choisi de faire des essais de culture en récupérant une partie du fermenteur afin de réaliser une fermentation en deux étapes. Pour cela nous avons récupéré la biomasse présente dans le fermenteur par centrifugation et nous avons ajouté les composants du milieu MRS (concentration identique à t0) qui sont essentiels au développement de la souche puis nous avons réinoculé avec un inoculum s'étant développé sur xylose (50 g/L) pour une biomasse cellulaire de 5.10^7 C/mL. D'autres essais ont été réalisés sans enlever la biomasse ou sans rajouter de milieu, mais ils n'ont pas donnée de résultats probants [Données non présentées].

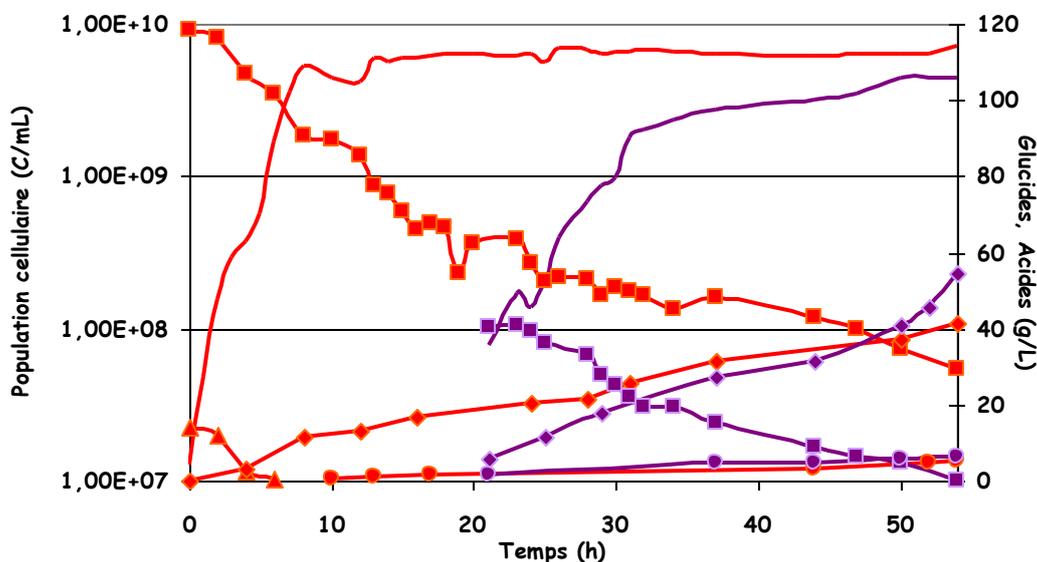


Figure 10 : Cinétiques de fermentation sur milieu MRS optimisé et sirop de son à une concentration finale de 120 g/L pour *L. bif fermentans* en 1 étape (rouge) ou 2 étapes (violet). (-) Population - (■) Consommation glucides - (▲) Glucose - (◆) Acide lactique - (●) Acide acétique.

Dans ce cas *L. bifementans* consomme totalement le xylose en 30 h de culture avec une biomasse légèrement plus faible que sur glucose et arabinose, mais ceci peut également être dû à la présence d'acide lactique qui va inhiber faiblement la croissance de la souche. Au final, la souche a consommé totalement les glucides composants le sirop de son dans le cas d'une fermentation multi-étagée en deux étapes alors qu'elle ne métabolise que 75% de ces glucides dans le cas d'une seule étape. Le rendement final en acide lactique est de 0,47 et 0,72 g/g respectivement pour la fermentation en une seule étape et celle en deux étapes [Tableau 10]. De plus, les différences avec les cultures sur MRS de base indiquent aussi qu'un basculement du métabolisme de la souche se produit vers la voie lactique homofermentaire au détriment de la voie lactique hétérofermentaire, même si celle-ci n'est pas complètement éliminée.

Tableau 10 : Comparaison des consommations et production d'acides entre les fermentations en 1 étape et 2 étapes sur milieu MRS modifié après 54 h de culture.

	Sucres conso. (g/L)	% sucres consommés	Ac. Lactique (g/L)	Ac. Acétique (g/L)	Yp/s (g ac.lact./g sucres)
1 étape	88	75,4	41,33	5,31	0,47
2 étapes	56 + 40	99,8	20,17 + 48,7	1,45 + 4,87	0,72

Les résultats obtenus à partir du kit de dosage pour l'acide lactique montrent une concentration d'acide D-lactique de 18,2 g/L pour 23,1 g/L d'acide L-lactique lors de la fermentation réalisée en une étape. Dans le procédé en deux étapes, on retrouve des concentrations de 6 g/L et 14 g/L après épuisement de l'arabinose et de 16 et 32 g/L lors de l'utilisation de l'arabinose, respectivement pour l'acide D- et L-lactique. On obtient par conséquent un rapport de 45/55% pour une étape et de 30/70 pour le procédé en deux étapes. Le milieu paraît également être plus intéressant vis-à-vis de ce rapport car au niveau industriel le but est d'obtenir un rendement en acide lactique le plus pur.

E. Immobilisation de *Lactobacillus bifementans* sur alginate de sodium

E.1. Étude des différents paramètres d'inclusion

E.1.1. Effet des ions sur l'immobilisation

Les conditions modérées pour l'immobilisation et sa simplicité sont certaines des raisons qui expliquent que l'alginate de sodium est la matrice d'immobilisation la plus couramment utilisée [Idris et Suzana, 2006 ; Taqieddin et Amiji, 2004]. Pour que les souches soient immobilisées, l'alginate de sodium est coulé dans une solution d'ions, en général le calcium [Carvahlo *et al.*, 2004]. Cependant Yoo *et al.* [1996] ont trouvé que l'utilisation de l'ion barium pour l'inclusion permettait d'augmenter la production d'acide lactique. Dans cette étude nous avons donc cherché à tester d'autres ions pour optimiser cette production d'acide lactique.

Tableau 11 : Effet des ions à 50 mM sur l'inclusion par alginate de sodium.

Ions	Résultats	Diamètre billes
CaCl ₂	Bonne inclusion	2 mm
AlCl ₃	Bonne inclusion	3 mm
MgCl ₂	Aucune liaison ion / alginate	-
MnCl ₂	Bille un peu molle	2 mm
CuCl ₂	Mauvaise liaison ion / alginate	-
ZnCl ₂	Bonne inclusion	2,5 mm
CoCl ₂	Bonne inclusion	2,5 mm
FeCl ₂	Bonne inclusion	3 mm

Dans un premier temps, nous avons d'abord observé l'effet des ions sur l'inclusion, les résultats sont présentés dans le [Tableau 11](#) et nous constatons ainsi que certains ions, qui sont utiles à la croissance et à la production d'acide pour *L. bifementans*, tels que Cu²⁺, Mg²⁺ ne permettent pas d'obtenir une bonne formation des billes d'alginate. Par conséquent, l'inclusion est mauvaise et les souches vont se retrouver dans le milieu de culture.

Pour la suite, nous avons donc décidé de conserver les ions Ca²⁺, Co²⁺ et Mn²⁺, ce dernier présentant les meilleures caractéristiques d'amélioration de la croissance et de la production d'acide lactique [Chapitre C.2.].

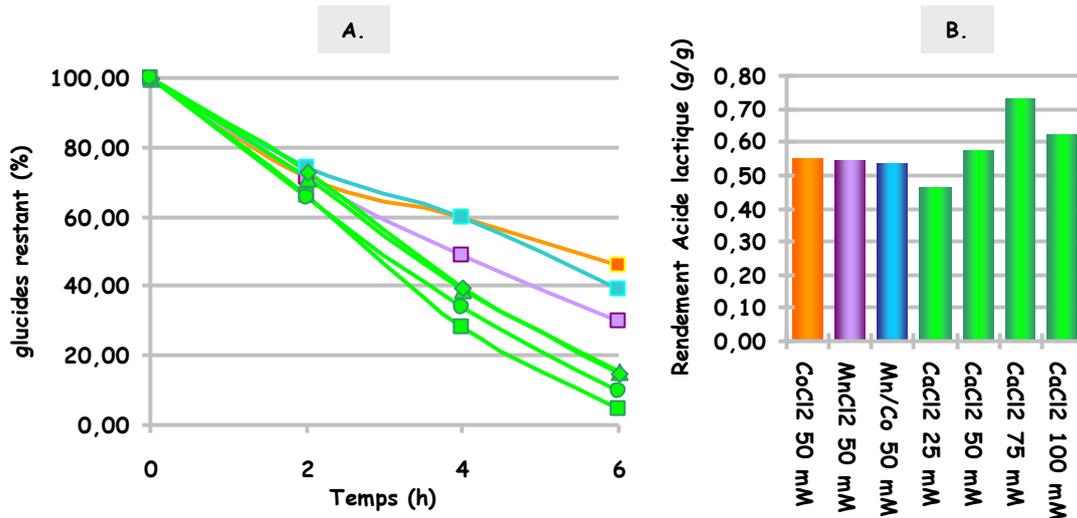


Figure 11 : Effet des ions utilisés et de leur molarité pour l'inclusion sur la consommation en arabinose (10 g/L) et la production d'acide lactique par *L. bifermantans*. **A** - consommation de l'arabinose. **B** - Rendement en acide lactique après 6 h de culture. (■) Cobalt - (□) Manganèse - (▣) Manganèse + Cobalt - (▲) Calcium 25 mM - (◆) 50 mM - (■) 75 mM - (●) 100 mM.

Les résultats obtenus montrent que l'ion qui apparaît le plus intéressant est le calcium avec une consommation qui est plus rapide et une production d'acide lactique plus élevée. Cependant quand on observe les rendements d'acide lactique produit par gramme de sucres consommés, on constate qu'ils sont similaires entre les 3 ions pour une molarité de 50 mM avec environ 0,57 g/g. Mais dans le cas du cobalt la consommation est la plus lente et ralentie lorsque 60 % des sucres sont consommés et est par conséquent moins intéressante. Pour l'ion manganèse, le problème rencontré est que les billes formées sont molles [Tableau 11] donc les risques de broyage de ces billes en réacteur sous agitation [Guoqiang *et al.*, 1992] et l'instabilité dans l'environnement physiologique sont beaucoup plus importants qu'avec l'ion calcium.

Dans un second temps, nous avons testé différentes molarités concernant l'ion calcium, on constate que la concentration optimale est de 75 mM et ceci nous permet également d'améliorer le rendement en acide lactique avec 0,74 g/g de sucres consommés. Par contre pour des molarités plus importantes la production est moins intéressante.

E.1.2. Le pourcentage d'alginate de sodium

L'arabinose a été consommé pour la plupart des concentrations d'alginate de sodium cependant la Figure 12 indique clairement que plus la concentration d'alginate de sodium est élevée pour une concentration supérieure à 2% plus la vitesse de l'utilisation de l'arabinose est

faible. La concentration en glucide diminue graduellement au cours du temps excepté pour une concentration d'alginate de sodium de 4%. La Figure 12 montre également la production d'acide lactique finale pendant le procédé de fermentation en fonction des diverses concentrations en alginate de sodium. La production d'acide lactique pour la concentration en alginate du sodium de 2% s'est avérée également être la plus intéressante avec une concentration de 2,59 g/L et un rendement de 0,53 g/g. Ces résultats semblent être en accord avec ceux obtenus par Goksungur et Guvenc [1999] où la concentration optimale en alginate de sodium est 2%.

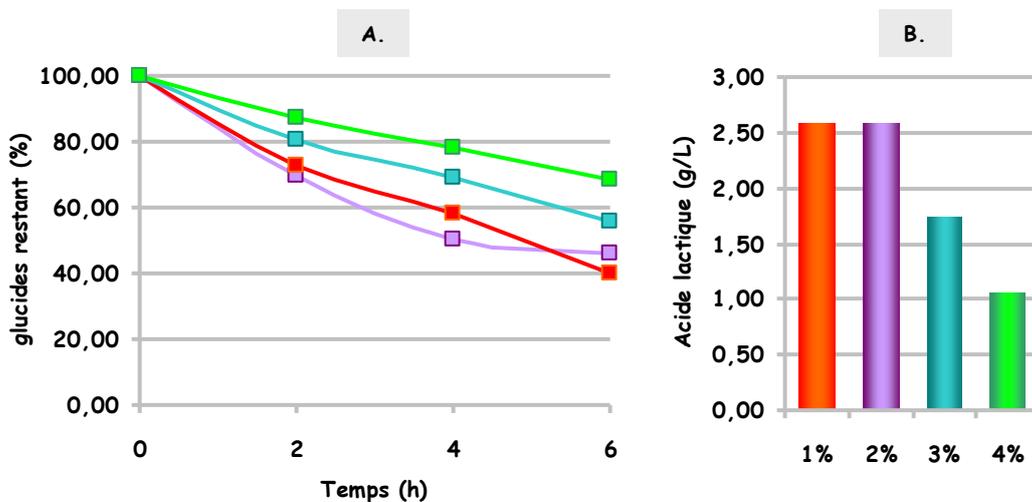


Figure 12 : Effet de la concentration en alginate de sodium sur la consommation en arabinose (10 g/L) et la production d'acide lactique par *L. bif fermentans*. **A** - consommation de l'arabinose. **B** - Acide lactique produit après 6 h de culture. Concentration en alginate : (■) 1% - (■) 2% - (■) 3% - (■) 4%.

Une concentration inférieure à 1% en alginate de sodium a comme conséquence des billes très molles tandis que l'augmentation de l'alginate de sodium supérieure à 2% durcit les billes, de ce fait des problèmes de diffusion peuvent se produire et les bactéries n'obtiennent pas assez de nutriments. Cependant quand la concentration est de 1% en alginate de sodium, les billes produites sont plus molles et peuvent être plus facilement cassées en raison de leur basse force mécanique, ayant pour résultat la fuite de bactéries des billes [Boyaval et Goulet, 1988 ; Idris et Suzana, 2006].

E.1.3. La biomasse immobilisée

L'immobilisation des bactéries est l'un des moyens pour la conservation de densités élevées de cellules dans le bioréacteur [Audet *et al.*, 1988; Guoqiang *et al.*, 1991; Krischke *et al.*, 1991; Goncalves *et al.*, 1992]. C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier l'effet de la phase de récupération des cellules et la quantité de biomasse à immobiliser sur la production d'acide lactique.

Tableau 12 : Effet de la phase de récupération de la biomasse et du substrat inducteur sur la consommation en arabinose ou en xylose et sur la production d'acide lactique par *L. bif fermentans*.

Source de carbone	Xylose			Arabinose		
	% glucide consommé	Acide lactique (g/L)	Yp/s (g/g)	% glucide consommé	Acide lactique (g/L)	Yp/s (g/g)
Phase de croissance:						
Exponentielle	31,5	2,91	0,92	45,4	4,36	0,96
Fin expo.	43,1	3,91	0,91	65	6,46	0,99
Stationnaire	29,8	2,57	0,86	52	4,08	0,78

Le [Tableau 12](#) nous montre que selon la phase de prélèvement la production est plus ou moins importante pour une concentration cellulaire immobilisée identique. La meilleure période de prélèvement est en fin de phase exponentielle.

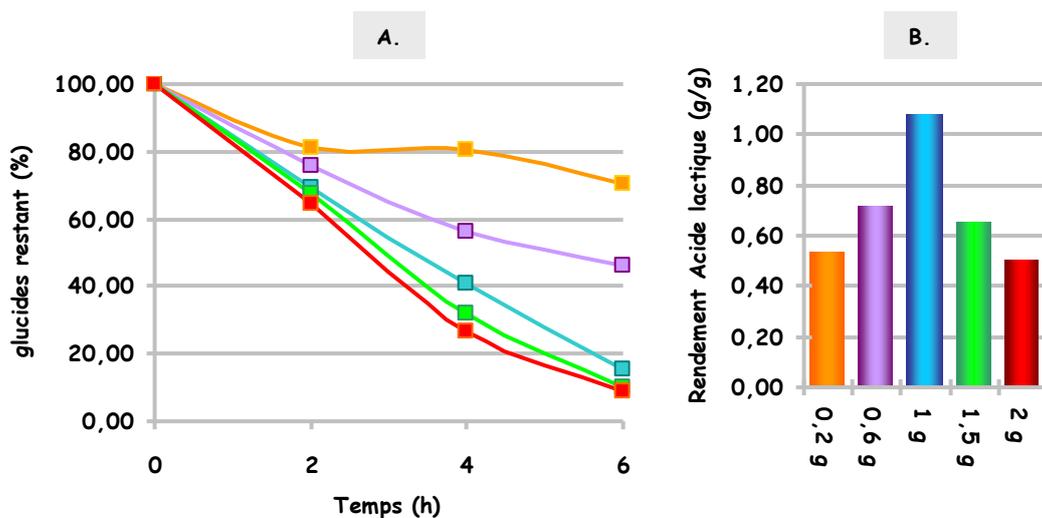


Figure 13 : Effet de la quantité de biomasse immobilisée pour 100 mL d'alginate sur la consommation en arabinose (10 g/L) et la production d'acide lactique par *L. bif fermentans*. **A** - consommation de l'arabinose. **B** - Acide lactique produit après 6 h de culture. (■) 0,2 g - (■) 0,6 g - (■) 1 g - (■) 1,5 g - (■) 2 g.

En outre, le rendement est optimal pour une biomasse de 1 g de cellules immobilisée pour 100 mL d'alginate de sodium [Figure 13].

Pour finir nous constatons que le substrat, xylose ou arabinose dans notre cas, utilisé comme inducteur pour la production de la biomasse joue un rôle sur la consommation des glucides et sur la production après immobilisation de la souche. Au vu des résultats obtenus dans le Tableau 12, il est préférable d'utiliser l'arabinose comme glucide inducteur pour la production de la biomasse.

E.1.4. La taille des billes d'alginate de sodium

Un paramètre important d'étude est la taille des billes d'alginate de sodium, considérant que les billes d'une plus grande taille vont permettre de suspendre une densité de cellules plus élevée. Cependant une fois en colonne l'espace interstitiel est plus grand et par conséquent on aura un moins bon transfert entre le milieu de culture et les billes [Senthuran *et al.*, 1999].

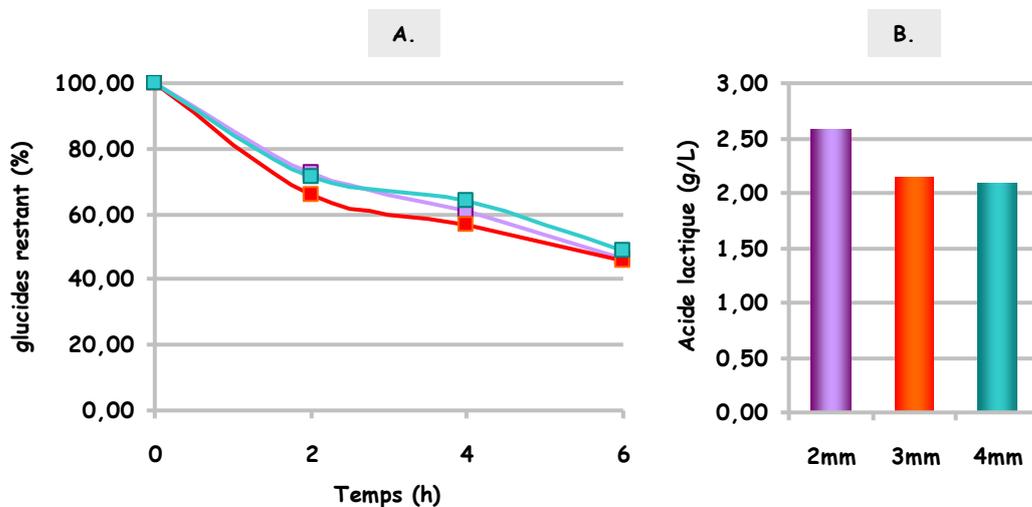


Figure 14 : Effet de la taille des billes sur la consommation en arabinose et la production d'acide lactique par *L. bifementans*. **A** - consommation de l'arabinose. **B** - Acide lactique produit après 6 h de culture. (■) 2 mm - (■) 3 mm - (■) 4 mm.

La Figure 14 montre les suivis de culture et la production finale en acide lactique selon les trois diamètres de billes. La concentration maximum en acide lactique a été atteinte pour le diamètre de 2 mm avec 2,6 g/L ou un rendement 0,53 g/g. Un accroissement du diamètre a eu comme conséquence une diminution de la consommation à 40% au lieu de 50% et de la production d'acide lactique à environ 2 g/L avec un rendement de 0,5 g/g. Le diamètre croissant de la taille des

billes au-delà de cette valeur n'a pas amélioré la production d'acide lactique. Un plus petit diamètre de billes permet une production plus élevée d'acide lactique, due à une augmentation du rapport surface avec le milieu de culture [Guoqiang *et al.*, 1991].

Les résultats obtenus semblent être en accord avec les études réalisées par Abdel-Naby *et al.* [1992] qui ont constaté que la production d'acide lactique augmente au fur et à mesure que la taille des billes diminue. Cependant, Idris et Suzana [2006] ont trouvé dans leur cas que le diamètre optimal était de 1 mm.

E.2. Étude des différents paramètres de culture

E.2.1. Température et pH

Pour étudier les effets du pH et de la température sur la production d'acide lactique, nous avons utilisé un plan d'expérience à 2 facteurs et 3 niveaux de 10 essais [Tableau 13]. Afin de confirmer la validité du modèle, des essais de reproductibilité ont aussi été réalisés (essais 5 et 6).

Tableau 13 : Matrice et réponses de l'effet de la température et du pH sur la production d'acide lactique par *L. bif fermentans* immobilisée [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	T °C	pH	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	30	4,5	56,49	2,01	0,12
2	30	6,0	70,47	11,94	0,56
3	30	7,5	72,24	12,79	0,54
4	35	4,5	61,37	2,60	0,14
5	35	6,0	73,99	15,11	0,70
6	35	6,0	74,36	15,38	0,69
7	35	7,5	74,90	17,33	0,59
8	40	4,5	56,38	1,65	0,10
9	40	6,0	65,94	15,09	0,76
10	40	7,5	68,37	19,23	0,94

La régression prévue pour la production d'acide lactique après élimination de toutes les limites et en fonction des valeurs codant pour les variables est représentée par l'équation suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = -119,30 + 2,64 x + 22,81 y - 0,053 x^2 + 0,23 xy - 2,16 y^2$$

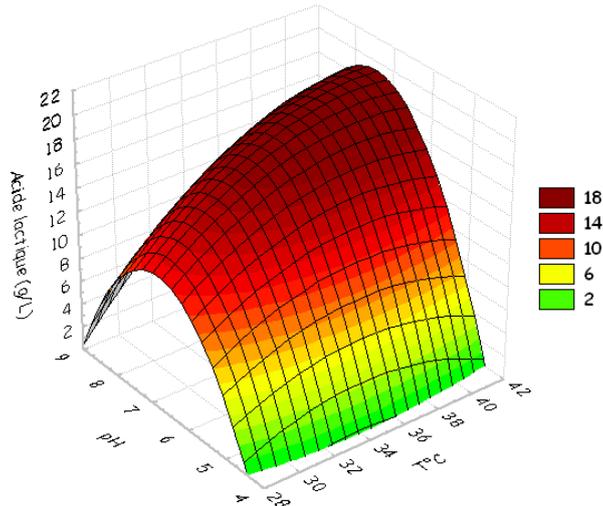


Figure 15 : Réponse en 3D de l'effet du pH et de la température sur la production d'acide lactique par *L. bif fermentans* immobilisée [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Le pH initial du milieu de culture joue un rôle significatif sur la production d'acide lactique et explique le fait que le maintien du pH au cours de la fermentation est un paramètre non négligeable si l'on veut obtenir une concentration finale en acide lactique et un rendement intéressant [Guoqiang *et al.*, 1992 ; Senthuran *et al.*, 1997]. En effet, on constate sur la Figure 15 que dès que l'on atteint des pH acides inférieurs à 6,0 la production d'acide lactique chute fortement. Au cours de la fermentation, le pH devra être maintenu dans une gamme de pH allant de 6,5 à 7,5 pour conserver une production optimale de la souche.

La température de croissance optimale de *L. bif fermentans* est de 35 °C sur pentose ce qui favorise la concentration maximale en cellules et contribue à la production maximum d'acide lactique. Sous sa forme immobilisée, la température optimale semble être aux alentours de 40-42 °C et en dessous de 35 °C la température ne favorise plus la croissance des cellules, ainsi la production d'acide lactique est diminuée. Grâce à l'immobilisation, la variation de la température lors d'une fermentation présente moins d'effet sur la production d'acide lactique. Des observations similaires ont été rapportées pour la souche *L. delbrueckii* sur molasses [Goksungur et Guvenc, 1999].

E.2.2. Effet des ions

Outre la température et le pH, d'autres paramètres vont avoir leur importance sur la production de *L. bif fermentans* immobilisée, tels que les ions. Pour cette étude nous avons donc

réalisé le même plan d'expérience que précédemment. Comme nous l'avons expliqué précédemment l'ion manganèse a un effet significatif sur les lactobacilles et l'ion calcium va lui avoir un effet sur le maintien de l'immobilisation.

Tableau 14 : Matrice et réponses de l'effet de la concentration des ions manganèse et calcium [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Mn (mM)	Ca (mM)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	0	5	37,58	7,27	0,65
2	0	10	43,58	7,72	0,55
3	0	15	50,29	6,77	0,42
4	2,5	5	30,53	9,82	0,68
5	2,5	10	44,64	11,48	0,72
6	2,5	10	37,68	10,04	0,78
7	2,5	15	37,59	8,92	0,71
8	5	5	25,93	10,15	1,18
9	5	10	29,18	10,59	1,06
10	5	15	35,59	10,24	0,82

La réponse caractérisant l'effet des ions calcium et manganèse sur la production d'acide lactique selon le modèle de second ordre est représenté par l'équation suivante :

$$\text{Ac. lactique (g/L)} = 4,955 + 1,393 x + 0,654 y - 0,179 x^2 + 0,012 xy - 0,036 y^2$$

Les effets des ions calcium et manganèse sont observés sur la production d'acide lactique sont décrits sur la [Figure 16](#). La production la plus élevée d'acide lactique a été obtenue à une concentration en calcium de 10 mM pour un rendement de 11,65 g/L. Les résultats obtenus montrent que l'ion calcium a eu un effet positif sur la production lactique. Cependant, un accroissement de la concentration en calcium a comme conséquence une diminution de cette même production. L'optimisation de l'ion manganèse dans les travaux précédents, de la fermentation lactique par la cellule libre, a présenté un effet positif à 2,5 mM sur la production. Comme on peut le constater sur la [Figure 16](#) pour la souche *L. bifementans* immobilisée sur Ca-alginate la concentration optimale est dans ce cas de 5 mM.

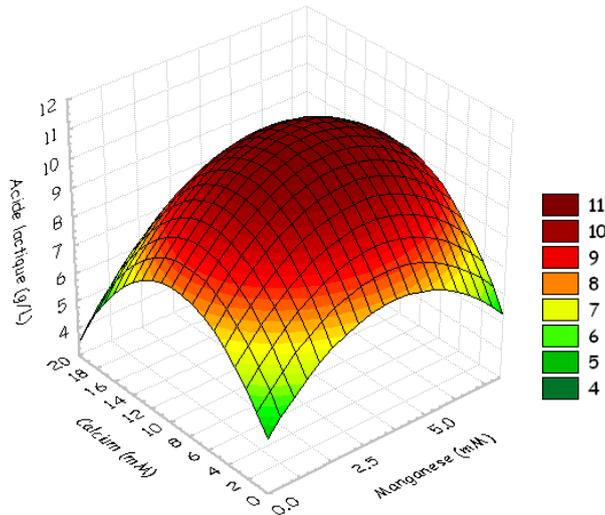


Figure 16 : Réponse en 3D de l'effet de la concentration en ions manganèse et calcium sur la production d'acide lactique par *L. bif fermentans* immobilisée [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

E.3. Étude de l'impact des composants du milieu MRS

Tableau 15: Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS sur la production d'acide lactique par *L. bif fermentans* immobilisée selon le plan de Plackett et Burman [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Pep. (g/L)	M.E. (g/L)	Y.E. (g/L)	Tw80 (g/L)	Ac. (g/L)	NH ₄ (g/L)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./g sucres)
1	17,5	2,5	1,25	1,5	8,75	0,5	70,8	14,73	0,87
2	17,5	17,5	8,75	0,5	1,25	0,5	58,8	12,72	0,97
3	2,5	2,5	1,25	0,5	1,25	0,5	57,8	6,08	0,38
4	17,5	2,5	8,75	0,5	8,75	0,5	65,5	13,2	0,80
5	17,5	2,5	8,75	1,5	1,25	3,5	65	12,81	0,85
6	17,5	17,5	1,25	1,5	1,25	0,5	61,8	13,08	0,93
7	2,5	17,5	1,25	1,5	1,25	3,5	64,8	8,87	0,55
8	2,5	17,5	1,25	0,5	8,75	0,5	67,7	11,17	0,74
9	2,5	2,5	8,75	1,5	1,25	0,5	65,1	13,47	0,82
10	17,5	17,5	1,25	0,5	8,75	3,5	64,7	12,62	0,86
11	2,5	2,5	1,25	1,5	8,75	3,5	66,2	12,68	0,74
12	2,5	2,5	8,75	0,5	8,75	3,5	68,6	12,66	0,83
13	2,5	17,5	8,75	1,5	8,75	0,5	67,4	14,36	0,89
14	17,5	2,5	1,25	0,5	1,25	3,5	63	8,76	0,58
15	2,5	17,5	8,75	0,5	1,25	3,5	70	11,82	0,75
16	17,5	17,5	8,75	1,5	8,75	3,5	60,8	15,77	1,24
17	10	10	5	1	5	2	67,8	10,87	0,64
18	10	10	5	1	5	2	68,8	14,33	0,84
19	10	10	5	1	5	2	70,8	14,73	0,87
20	10	10	5	1	5	2	58,8	12,72	0,97

Les expériences de criblage ont été réalisées pour évaluer l'impact de six facteurs, concentrations de la peptone de caséine, de l'extrait de levure et de viande, du Tween 80, de l'acétate de sodium, et du sulfate d'ammonium. De plus, le citrate, le phosphate ont la capacité de remplacer les ions calcium au niveau de l'inclusion et ont donc été directement supprimés du milieu de culture. Une conception factorielle partielle à deux niveaux a été utilisée et les résultats de la conception factorielle partielle sont présentés dans le [Tableau 15](#). La production d'acide lactique a changé nettement dans une gamme de 6,08 g/L à 15,77 g/L. Ces résultats suggèrent que ces variables affectent de manière significative la production d'acide lactique. L'effet des différents composants sont présentés dans le [Tableau 16](#).

Tableau 16 : Résultats de l'analyse de Plackett et Burman pour la production d'acide lactique.

Composants	Effets	Erreur standard	Valeur-t	Valeur-P	Confiance (%)
Peptone	0,744	0,613	1,214	0,044	95,61
Extrait de viande	0,332	0,613	0,542	0,684	31,64
Extrait de levure	1,132	0,613	1,847	0,041	95,93
Tween80	1,002	0,613	1,636	0,049	95,06
Acétate de Sodium	1,180	0,613	1,925	0,030	96,95
Sulfate d'Ammonium	-0,221	0,613	-0,360	0,780	22,02

Le niveau de confiance des composants NH_4PO_4 et de l'extrait de viande sont inférieurs à 95% pour la production d'acide lactique et par conséquent, sont considérés insignifiants. Le reste des composants, la peptone de caséine, l'extrait de levure, le Tween80 et l'acétate de sodium ont montré un niveau de confiance supérieur à 95% et sont considérés significatifs. Les principaux composants qui montrent un effet positif sur la production d'acide lactique sont l'extrait de levure, le Tween 80 et l'acétate de sodium et dans une moindre mesure la peptone de caséine.

Afin de compléter l'étude sur la meilleure formulation du milieu de fermentation pour la production d'acide lactique à partir du sirop de son de blé par la souche immobilisée *L. bifementans*, nous avons choisi un plan composite centré réduit de type CCF, un plan complet à 4 facteurs correspondant à 30 essais [[Tableau 17](#)].

Tableau 17 : Matrice des essais et réponses des différents composants du milieu MRS sur la production d'acide lactique par *L. bifementans* immobilisée [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

Essais	Pep. (g/L)	Y.E. (g/L)	Tw80 (g/L)	Ac. (g/L)	% sucres consommés	Ac. lact. (g/L)	Y (g ac.lact./ g sucres)
1	5	2,5	0,5	2,5	62,9	9,04	0,72
2	15	2,5	0,5	2,5	63,9	10,06	0,73
3	5	7,5	0,5	2,5	64,3	9,76	0,75
4	15	7,5	0,5	2,5	65,1	9,72	0,68
5	5	2,5	1,5	2,5	63,3	9,34	0,65
6	15	2,5	1,5	2,5	63,9	10,44	0,71
7	5	7,5	1,5	2,5	62,9	8,11	0,62
8	15	7,5	1,5	2,5	64,8	10,43	0,74
9	5	2,5	0,5	7,5	61,1	9,17	0,73
10	15	2,5	0,5	7,5	63,4	9,48	0,68
11	5	7,5	0,5	7,5	63,5	10,34	0,76
12	15	7,5	0,5	7,5	64,9	11,19	0,83
13	5	2,5	1,5	7,5	62,4	9,86	0,73
14	15	2,5	1,5	7,5	62,3	10,05	0,76
15	5	7,5	1,5	7,5	64,3	9,43	0,71
16	15	7,5	1,5	7,5	63,2	9,73	0,75
17	0	5	1	5	60	10,51	0,86
18	20	5	1	5	62,7	10,22	0,79
19	10	0	1	5	58,3	9,62	0,84
20	10	10	1	5	63,4	9,69	0,79
21	10	5	0	5	59,5	10,35	0,92
22	10	5	2	5	60,1	9,86	0,85
23	10	5	1	0	61,7	10,37	0,80
24	10	5	1	10	63,2	5,33	0,40
25	10	5	1	5	59,8	10,13	0,82
26	10	5	1	5	62,2	9,50	0,73
27	10	5	1	5	62,4	8,66	0,66
28	10	5	1	5	59,6	10,26	0,98
29	10	5	1	5	59,6	9,53	0,81
30	10	5	1	5	59,4	10,76	0,91

La représentation 3D [Figure 17] nous permet de visualiser la réponse, le rendement en acide lactique, en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. On peut ainsi observer que finalement le Tween 80 ne joue pas un rôle essentiel sur la production d'acide lactique quand on prend en compte les interactions. De plus, il s'agit d'une différence importante avec les besoins de la souche sur culture simple qui a absolument besoin de Tween 80 pour se développer.

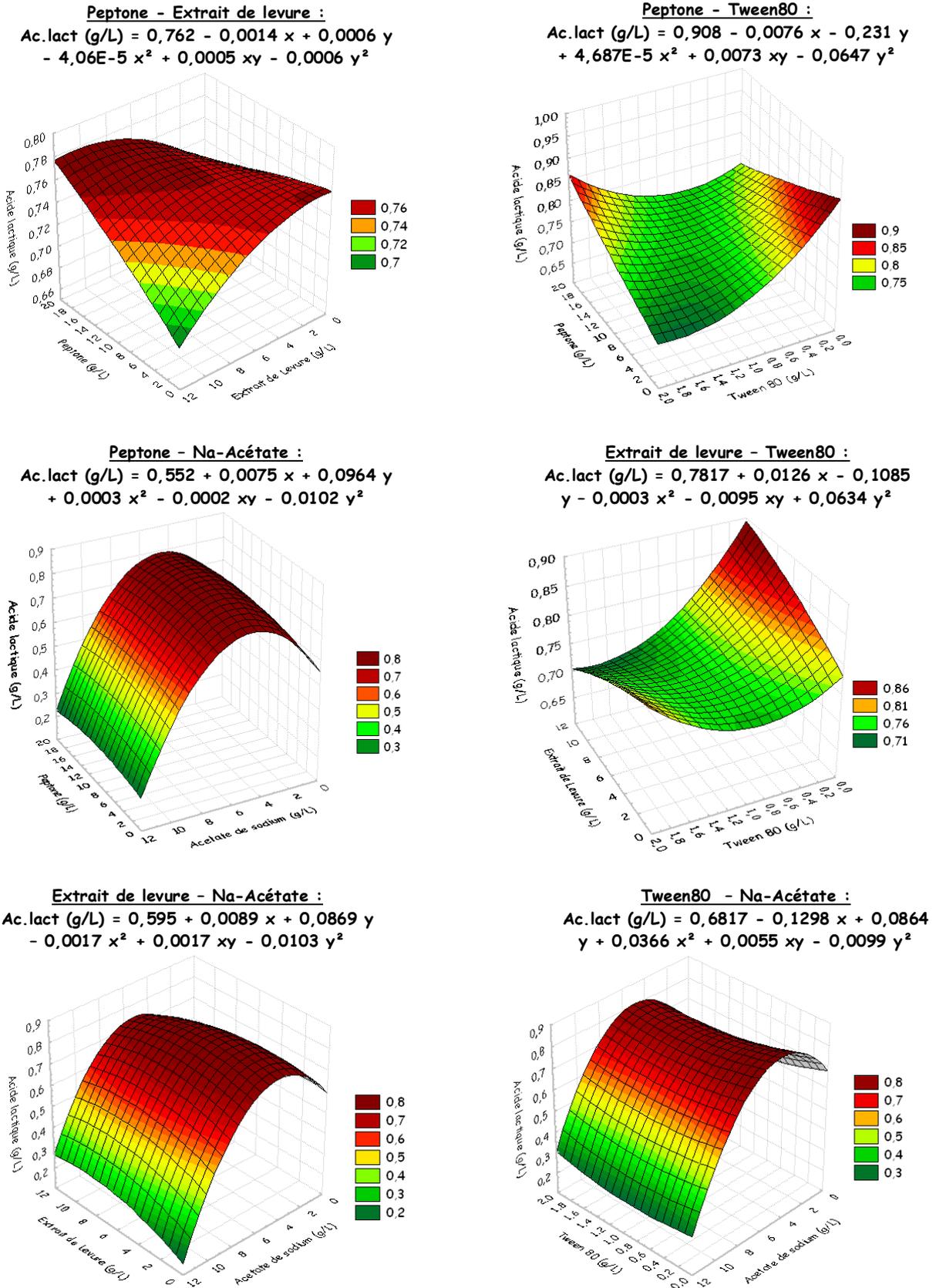


Figure 17 : Surfaces de réponses de la production d'acide lactique pour la modélisation du milieu MRS pour la souche immobilisée *L. bif fermentans* [voir Matériel et Méthodes, E.4.].

En ce qui concerne l'acétate de sodium, son effet est optimal pour des concentrations de 4 à 5 g/L, de même on peut déterminer que l'effet de l'extrait de levure va être de plus en plus important plus on augmente la concentration de celui-ci. Pour la peptone son effet est un peu plus complexe selon le composant que l'on a utilisé pour déterminer leur interaction, cependant on constate tout de même que l'effet est optimal pour des concentrations étant dans une gamme de 15 à 20 g/L.

E.4. Comparaison de fermentations entre milieux MRS de base/MRS modifié et Conclusion

Pour finir nous avons réalisé une comparaison de fermentation liquide en réacteur batch à partir du milieu MRS de base et du milieu modifié (15 g/L de peptone de caséine, 4 g/L d'extrait de viande, 12 g/L d'extrait de levure, 1 g/L Tween80, 2 g/L de sulfate d'ammonium, 5 mM de manganèse et 5 mM de calcium) et dans les conditions de culture déterminées précédemment, c'est-à-dire pour une température de 42 °C et un pH de 7,0. Pour cela nous avons complété le milieu avec du sirop de son de blé pour une concentration d'environ 100 g/L. Les billes ont été préparées avec la biomasse obtenue à partir d'un fermenteur de 2 L sur milieu MRS et complété avec de l'arabinose (10 g/L). Après récupération de la biomasse, l'inclusion a été réalisée sur alginate de sodium à l'aide de l'ion Ca²⁺ (50 mM). Pour chaque fermenteur environ 50 mL de billes ont été ajoutés aux 200 mL de milieu de culture. La fermentation a été réalisée à 42 °C, pH 7,5 et le pH a été maintenu constamment à l'aide de NaOH à 10 N.

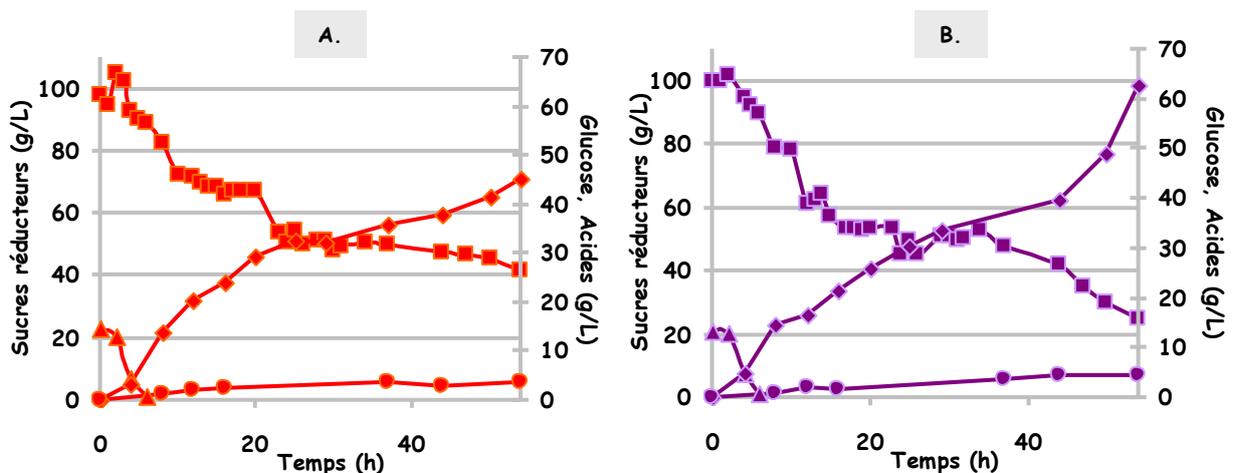


Figure 18 : Comparaison des cinétiques de fermentation entre milieux **A** - MRS de base et **B** - milieu MRS modifié pour *L. bifermens* immobilisée sur Ca-alginate. Suivi de consommation des glucides et de production d'acides. (■) Consommation glucides - (▲) Glucose - (◆) Acide lactique - (●) Acide acétique.

La comparaison des deux cinétiques montre bien que le milieu optimisé permet effectivement d'améliorer la production d'acide lactique avec au final 63 g/L produits pour seulement 45 g/L sur milieu MRS de base. La principale raison de ces différences est la différence de consommation des glucides avec au bout de 54 h de culture 76% de sucres consommés pour le milieu modifié pour seulement 60% sur le milieu MRS de base. Au final, nous obtenons un rendement de 0,83 g/g pour le milieu modifié et de 0,71 g/g pour le milieu de base [Tableau 18], pour une vitesse moyenne de consommation des sucres de 1,4 g/h et de 1,17 g/h, respectivement.

Tableau 18 : Comparaison des consommations et production d'acides entre les fermentations sur milieu MRS de base et modifié après 54 h de culture.

	Sucres conso. (g/L)	% sucres consommés	Ac. Lactique (g/L)	Ac. Acétique (g/L)	Yp/s (g ac. lact./ g sucres)
MRS de base	63,51	60,6	45,24	3,58	0,71
MRS modifié	75,46	75	62,77	4,34	0,83

De même que pour la fermentation par cellules libres nous avons observé le rapport acide D- et L-lactique, dans le cas de l'immobilisation l'effet du milieu est moins conséquent. En effet, on retrouve des concentrations de 8,3 g/L et 36,9 g/L sur le milieu MRS et de 15,1 g/L et 47,7 g/L sur le milieu modifié, respectivement pour l'acide D- et L-lactique. De plus, cet effet serait légèrement en faveur du milieu MRS avec un rapport de 18/82% et de 24/76% pour le milieu optimisé. Cependant, au vu de l'amélioration du rendement et par rapport à la culture sur cellules libres, cette optimisation est tout de même significative.

En conclusion générale sur les différents procédés entre les cellules libres et les cellules immobilisées, l'immobilisation a permis d'améliorer le rendement en acide lactique par rapport aux cellules libres. Cependant, pour une même durée de culture, la productivité et la consommation en glucides ont été plus faibles avec seulement 1,16 g/L/h d'acide lactique produit et 75 g/L de sucres consommés par les cellules immobilisées alors que l'on a respectivement 1,28 g/L/h d'acide lactique produit et 96 g/L de glucides consommés par fermentation multi-étagées. La principale hypothèse de cette diminution est certainement due aux problèmes de diffusion et donc d'accessibilité aux substrats par les cellules immobilisées. Par conséquent, un autre procédé qu'il serait intéressant de tester, serait d'effectuer ce procédé d'immobilisation en culture continue par fermentation multi-étagée en bioréacteur ou en colonne.

Résultats et Discussion : Détection des cétoles

A. Introduction et hypothèse de travail

Cette étude doit nous permettre par la suite d'étudier les enzymes de type isomérases. D'une part, ces enzymes sont utilisées sous forme immobilisée pour la production de divers sirop. D'autre part, elles peuvent être utilisées dans des procédés de fermentation afin de produire les cétoles correspondants aux pentoses et qui eux sont plus facilement utilisables par les micro-organismes. Cette dernière possibilité permet d'envisager d'autres voies de valorisation des pentoses pour la production d'acide lactique à partir de micro-organismes qui ne présentent pas la capacité de métaboliser les pentoses.

À ce jour, il y a principalement deux méthodes de dosages chimiques qui permettent la détermination des activités enzymatiques isomérases en déterminant la quantité de cétoles produits. La première décrit par [Dische et Borenfreund](#), qui est généralement appliquée, est l'essai au carbazol couplé à l'acide sulfurique et l'absorbance est lue à 560 nm [[Dische et Borenfreund, 1951](#) ; [Jørgensen et al., 2004](#) ; [Lee et al., 2004](#) ; [Lee et al., 2005](#)]. Cependant, elle n'est pas très sensible et les résultats obtenus ne sont pas reproductibles. L'autre méthode est une modification du test au résorcinol de [Kulka](#) pour la détermination des cétoles, D-Xylulose et D-fructose, décrit par [Schenk et Bisswanger](#) [[Kulka, 1956](#) ; [Schenk et Bisswanger, 1998](#)]. Nous avons donc décidé d'adapter ce dosage pour la détection du ribulose et du tagatose, et ce, afin de pouvoir purifier et caractériser plus facilement l'activité L-arabinose isomérase à partir de la bactérie lactique *L. bifementans* [voir Chapitre 1, D.1.2.].

Une méthode utilisée lors des purifications d'enzyme est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAA) qui est intensivement employée comme technique pour la séparation et la caractérisation des protéines [[Andersson et al., 1971](#) ; [Bryan, 1976](#) ; [Gabriel et Wang, 1968](#)]. La principale technique employée pour détecter les activités isomérases sur le gel de PAA est la réaction de l'oxydation au chlorure 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC) par le cétole avec la formation de formazan [[Sapunova et al., 2004](#)]. Par conséquent, nous avons également modifié et

optimisé la méthode au TTC, afin d'obtenir une meilleure détection de l'activité arabinose isomérase.

Diverses méthodes de chromatographie liquide (CLHP) et d'autres méthodes telles que la chromatographie en phase gazeuse et la chromatographie échangeuse d'ions (HPAEC) [Hanko et Rohrer, 2000 ; Lee, 1996] ou la spectroscopie infra-rouge (IRE) [Bellon *et al.*, 1994] ont été développées pour la détermination des glucides et de leurs isomères correspondants, mais pour le mélange biologique complexe, ces méthodes ne sont pas adaptées. La préparation appropriée des échantillons est également la principale difficulté rencontrée pour la chromatographie en phase gazeuse [Andrews, 1989]. Aucune de ces méthodes ne permet la détermination de petites quantités de cétooses tels que le ribulose ou le xylulose en présence de grandes quantités d'aldoses correspondants.

Dans la partie « D » de ce chapitre 4, nous souhaitons rapporter les résultats d'un protocole CLHP permettant l'analyse sélective des cétooses dans le mélange complexe, en utilisant la détection UV. Dans les pentoses deux types de structures primaires sont trouvés : les aldoses et les cétooses. Dans les pentuloses la forme fermée pyranose est rendue impossible. Köpper et Freimund [2003] ont démontré par analyse RMN que la principale forme isomérique dans l'eau sous laquelle sont trouvés le ribulose et le xylulose était la cétone contenant la forme ouverte, le reste étant le mélange des deux furanoses cycliques anomériques [Figure 1]. La présence de cette fonction libre de cétone nous a permis d'effectuer la détection UV sélective du ribulose et du xylulose. De plus, cette méthode présente également l'avantage de pouvoir détecter et quantifier plusieurs cétooses, tels que le ribulose et le xylulose, dans le même échantillon ce qui n'est pas faisable avec les méthodes classiques de dosage qui permettent seulement une quantification globale des cétooses sans pouvoir distinguer la quantité de chaque cétose. L'intérêt est de pouvoir réaliser un suivi lors de fermentation simultanée avec l'isomérisation, qui peut être utilisée pour la fermentation alcoolique par les levures de ressources renouvelables, telles que le sirop de son de blé, et qui contiennent plusieurs glucides différents.

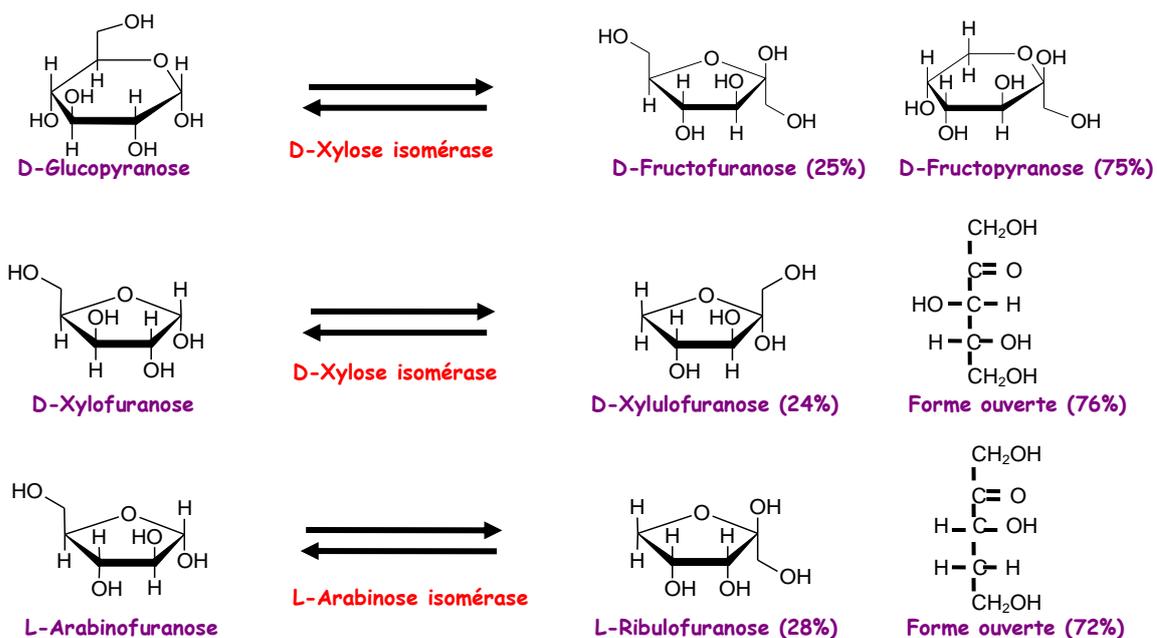


Figure 1 : Représentations des principales formes -uloses obtenues par action d'isomérases ainsi que leur rapport dans l'eau à 25 °C [Lichtenthaler, 2002].

B. Dosage du ribulose et du tagatose

B.1. Détermination de la longueur d'onde

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer la longueur d'onde à laquelle chaque cétose est détecté. Ceci a été effectué en employant le protocole de [Schenk et Bisswanger \[1998\]](#). Dans ces conditions le complexe formé entre le résorcinol et le $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ avec le D-ribulose est rouge-brun et deux longueurs d'onde présentent un maximum d'absorbance pour ce cétose à 535 nm et à 600 nm. En ce qui concerne le D-tagatose il y a formation d'un complexe jaune vert pour une longueur d'onde de 665 nm.

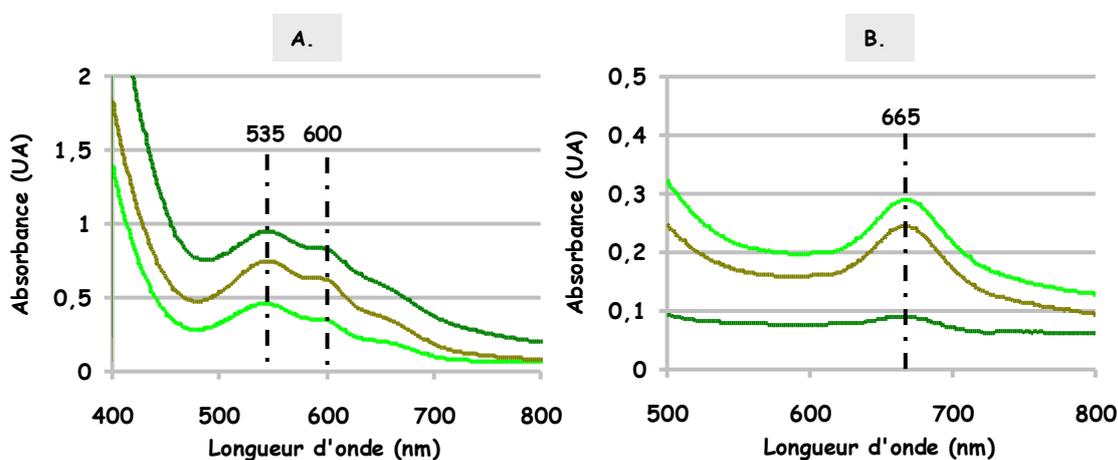


Figure 2 : Spectre d'absorbance en fonction de différentes molarités de ribulose et de tagatose. **A** - 1 (—) - 2,5 (—) - 5 (—) mM D-ribulose. **B** - D-tagatose par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min.

B.2. Effet des différentes solutions sur la détection

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer les concentrations des diverses solutions utilisées dans le test au résorcinol afin de limiter l'interférence des aldoses (L-arabinose et D-galactose) qui sont employés comme substrat de l'enzyme L-arabinose isomérase [[voir Synthèse des connaissances, D.1.2.](#)] et qui sont supérieures comparés à la quantité de cétose (D-ribulose et D-tagatose) produite par l'enzyme. Dans chaque cas les essais ont été effectués sur le cétose ou l'aldose correspondant et en effectuant un balayage spectral de 500 à 700 nm à une température de 80 °C après une incubation de 20 min.

B.2.1. $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$

Le sulfate d'ammonium ferrique est l'un des composants principaux qui permet le complexe avec le résorcinol et le cétose. En conséquence, le fait de modifier les concentrations doit permettre de trouver la concentration optimale pour détecter les cétones tout en tenant compte de l'interférence des aldoses sur l'analyse.

Nous constatons sur les graphiques ci-dessous que la quantité optimale permettant la meilleure détection des cétones est 0,054 g dans 50 mL d'acide chlorhydrique. D'ailleurs avec cette concentration, on observe que le D-galactose n'a aucune interférence. De plus dans le cas du L-arabinose on note que l'interférence est importante pour la longueur d'onde de 600 nm, mais est faible à 535 nm.

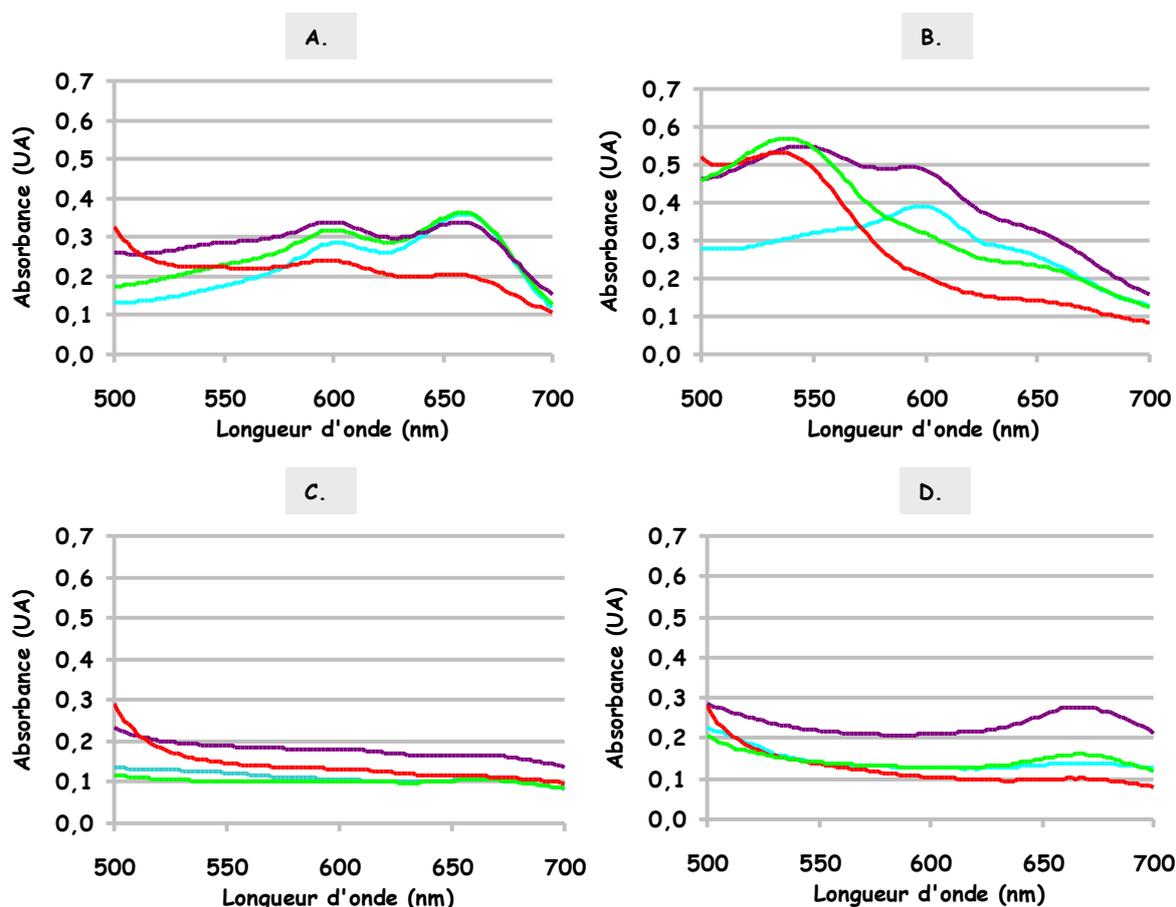


Figure 3 : Spectre d'absorbance en fonction de différentes quantités de sulfate d'ammonium ferrique : 0,014 g (—) - 0,054 g (—) - 0,216 g (—) - 0,864 g (—) dans 50 mL. **A** - L-arabinose (100 mM). **B** - D-ribulose (2 mM). **C** - D-galactose (100 mM). **D** - D-tagatose (2 mM). Détection par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min.

B.2.2. HCl

Le test au résorcinol doit être effectué dans des conditions très acides de pH. En effet quand la molarité des acides est modifiée on se rend compte qu'on a plus aucune détection des cétones (D-ribulose et D-tagatose) comme on peut l'observer sur les graphiques ci-dessous. En conséquence, aucune modification ne peut être effectuée.

D'autres acides ont également été testés pour ce dosage, tel que l'acide acétique, l'acide sulfurique, l'acide propionique,... cependant, aucun de ces acides n'a permis la détection des cétones [données non montrées].

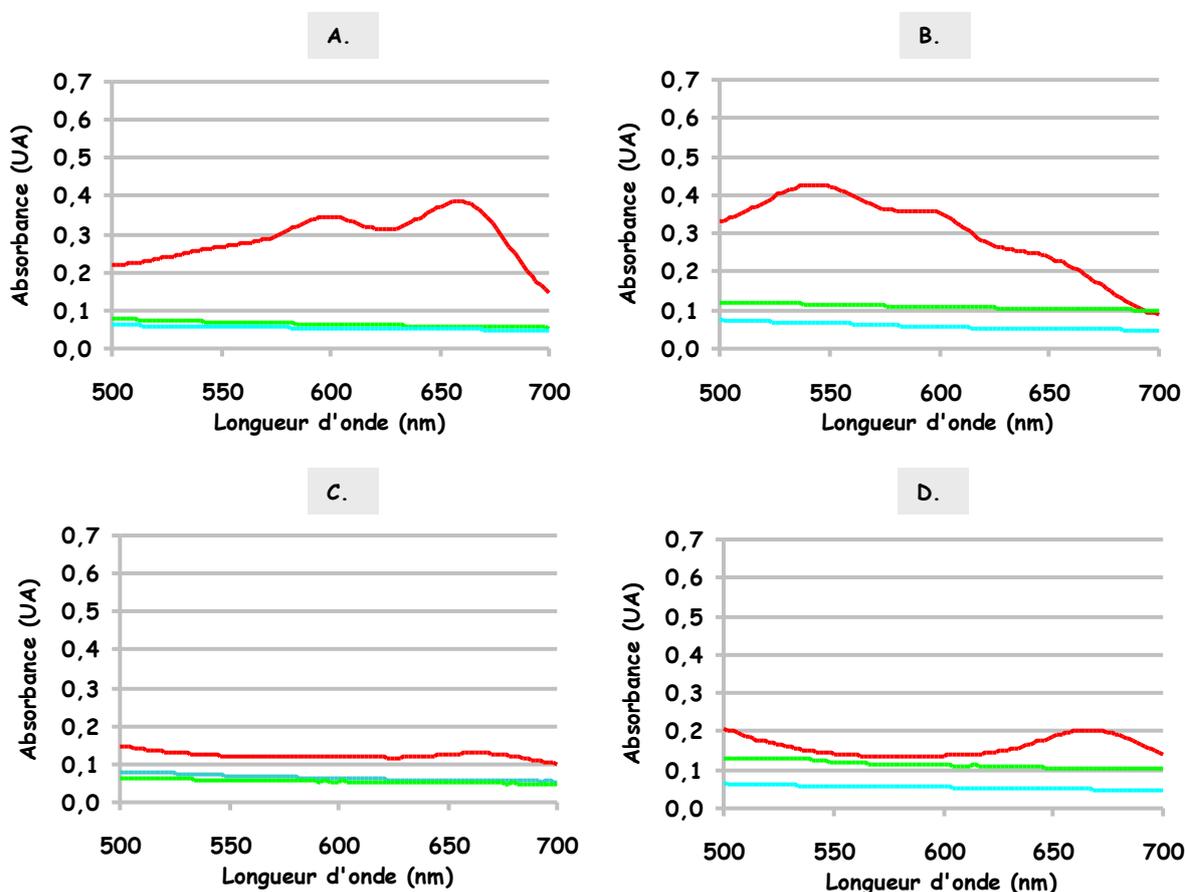


Figure 4 : Spectre d'absorbance en fonction de différentes molarités d'acide chlorhydrique : 3 N (—) - 6 N (—) - 12 N (—). **A** - L-arabinose (100 mM). **B** - D-ribulose (2 mM). **C** - D-galactose (100 mM). **D** - D-tagatose (2 mM). Détection par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min.

B.2.3. Ethanol

Les essais effectués à partir de différents pourcentages d'éthanol ne provoquent pas d'interférence des aldoses sur le dosage pour le L-arabinose à la longueur d'onde de 535 nm ou du D-galactose pour la longueur d'onde de 665 nm. Au contraire, la détection des cétooses change selon les pourcentages d'éthanol utilisés.

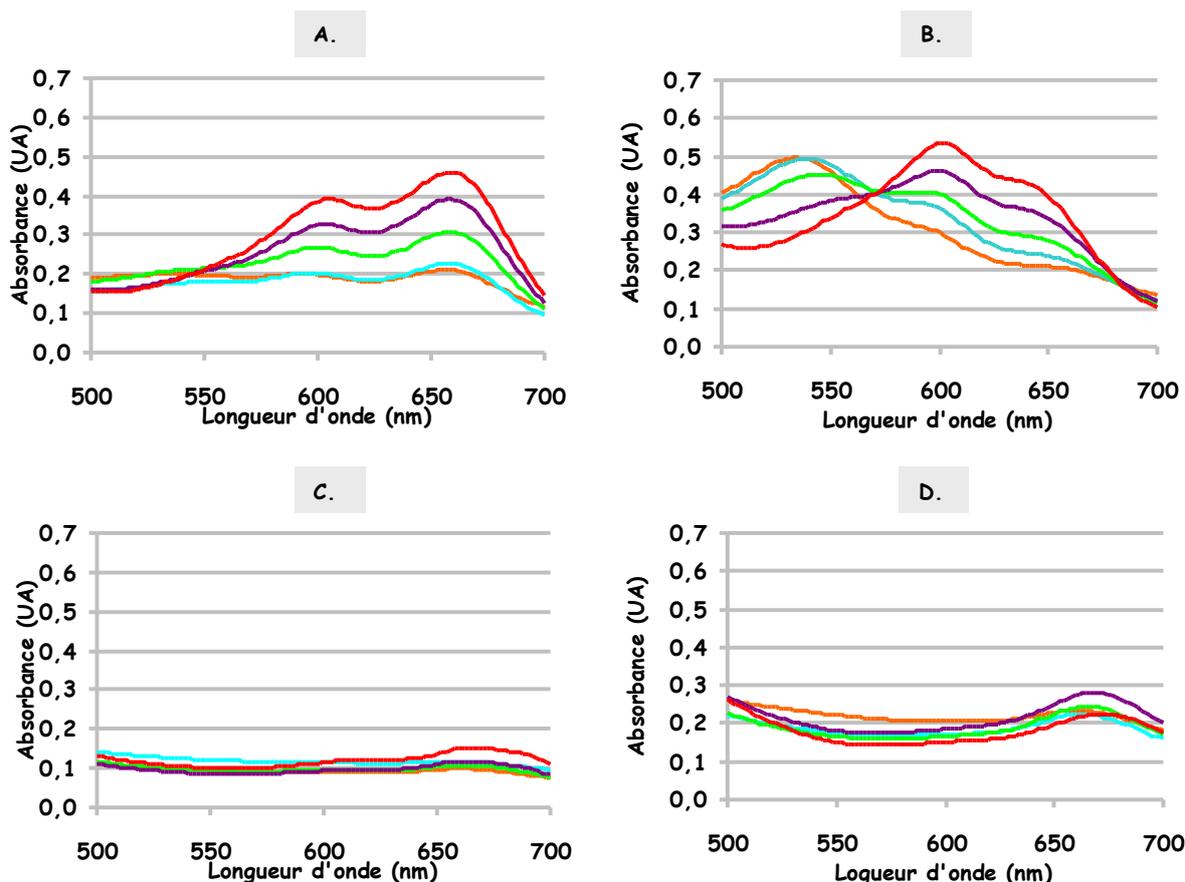


Figure 5 : Spectre d'absorbance en fonction de différents pourcentages d'éthanol : 10% (—) - 30% (—) - 50% (—) - 70% (—) - 90% (—). **A** - L-arabinose (100 mM). **B** - D-ribulose (2 mM). **C** - D-galactose (100 mM). **D** - D-tagatose (2 mM). Détection par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min.

Dans le cas du D-ribulose le pourcentage pour lequel on obtient l'absorbance maximum est retrouvée avec 30% d'éthanol alors que pour le D-tagatose aucune détection n'est observée avec ce pourcentage. Le seul pourcentage qui présente de l'intérêt pour la détection du D-tagatose est de 50%. De plus dans le cas de la détection du ribulose la différence est faible entre 30 et 50%. C'est par conséquent le dernier pourcentage qui a été maintenu pour la suite du protocole.

B.2.4. Résorcinol

Le résorcinol est le deuxième composant principal permettant la formation du complexe et par conséquent la coloration. L'intensité de la couleur dépend de la quantité de résorcinol supplémentaire. À mesure que la quantité de résorcinol est augmentée, l'absorbance augmente jusqu'à un maximum et va ensuite diminuer rapidement.

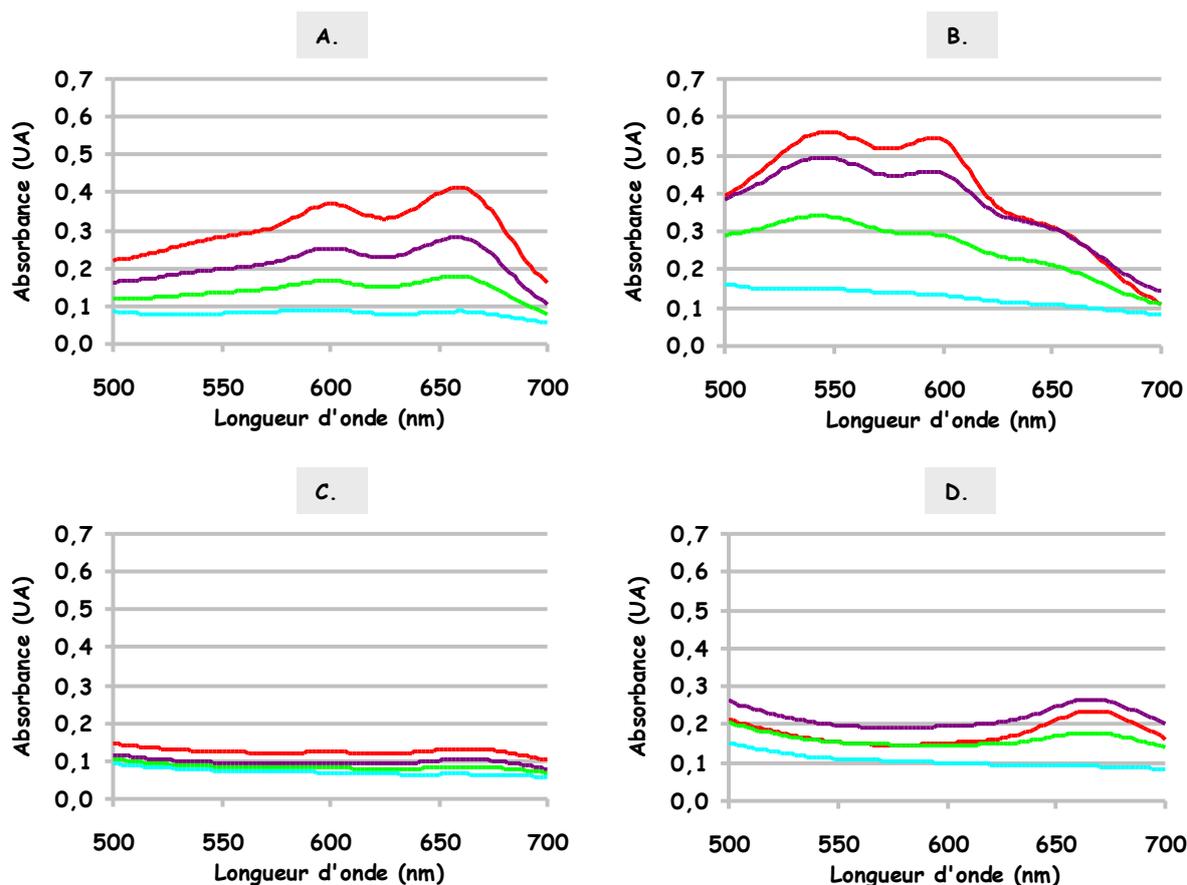


Figure 6 : Spectre d'absorbance en fonction de différentes quantités de résorcinol : 0,01% (—) - 0,025% (—) - 0,05% (—) - 0,075% (—). **A** - L-arabinose (100 mM). **B** - D-ribulose (2 mM). **C** - D-galactose (100 mM). **D** - D-tagatose (2 mM). Détection par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min.

Dans nos conditions, le maximum d'absorbance est obtenu à partir de 0,075% de résorcinol dans le cas du L-ribulose, mais présente une interférence plus importante pour le L-arabinose, ce qui n'est pas vérifié dans le cas du D-galactose. Par contre pour le D-tagatose le maximum d'absorbance est obtenu à 0,05%.

B.3. Interférences sur le dosage

B.3.1. Arabinose et galactose

En employant les concentrations déterminées par les essais précédents, c.-à-d. 0,054 g de $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ dans 50 mL d'acide chlorhydrique, l'éthanol 50% avec du résorcinol 0,05%, nous avons alors déterminé à partir de quelle durée d'incubation on va observer une interférence des substrats (L-arabinose ou D-galactose) de la L-arabinose isomérase.

Les aldoses commencent à former un complexe avec le résorcinol et le sulfate d'ammonium après 20 min d'incubation à 80 °C. Cependant, aucune interférence n'est détectée sur le dosage après 20 min pour des concentrations de 200 mM dans le cas du L-arabinose et des 100 mM en ce qui concerne le D-galactose.

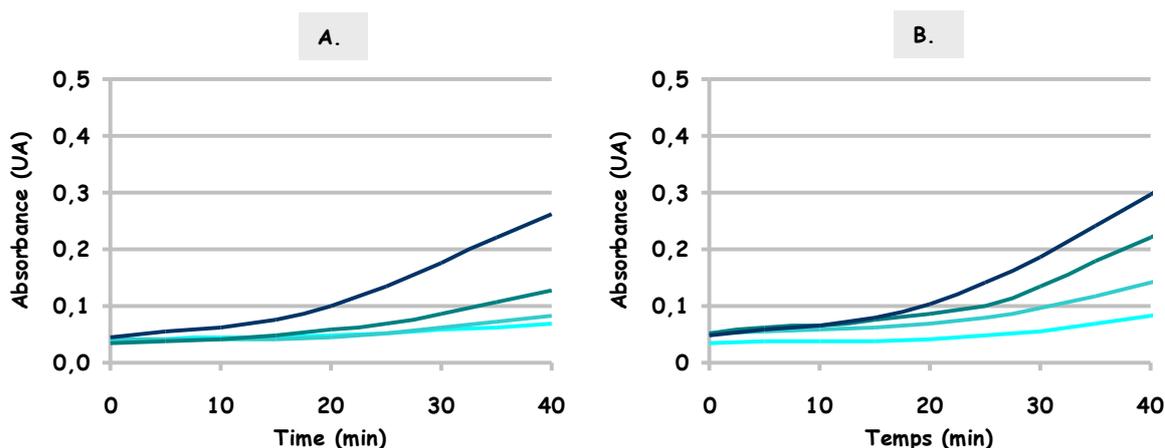


Figure 7 : Absorbance en fonction du temps de l'arabinose et du galactose à partir de différentes concentrations. **A** - 50 (—) - 100 (—) - 200 (—) - 500 (—) mM L-arabinose. **B** - 25 (—) - 50 (—) - 100 (—) - 250 (—) mM D-galactose (B) par le test au résorcinol à 80 °C après 20 min.

B.3.2. pH

Lors de la caractérisation des activités enzymatiques, l'une des principales études est l'effet de la variation du pH et également au cours des étapes de purification l'utilisation de différents tampons. Nous avons ainsi testé plusieurs tampons afin d'observer l'influence qu'ils pourraient avoir sur l'analyse selon que l'on soit à pH acide ou basique, mais également si pour un même pH on obtient la même densité optique avec des tampons différents. Les résultats obtenus

n'ont montré aucune différence au niveau de l'absorbance finale, excepté les erreurs traditionnelles de l'analyse.

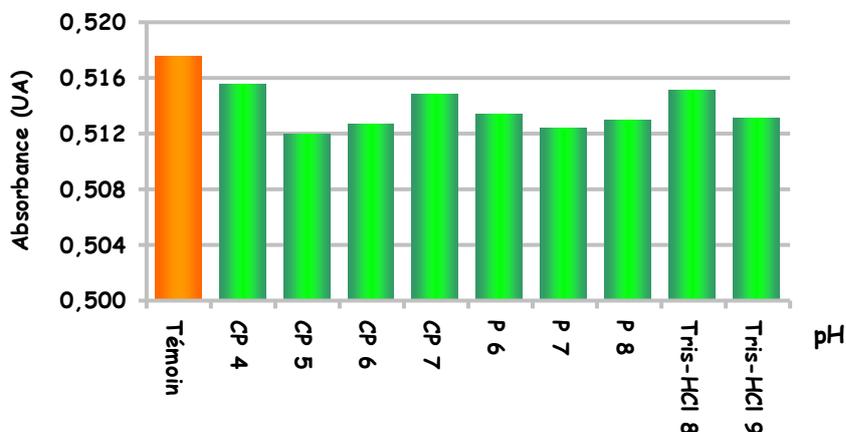


Figure 8 : Effet de différents tampons et pH sur le dosage. CP = citrate phosphate, P = phosphate et Tris-HCl par le test au résorcinol à 80 °C et l'absorbance est mesurée après 20 min.

B.3.3. Dépendance de l'absorbance maximum

Pour réaliser cette gamme, nous avons utilisé le protocole cité ci-dessus, nous notons que l'essai est linéaire jusqu'à une concentration de 5 mM dans le cas du D-tagatose à 665 nm et de même pour le L-ribulose à 535 nm par contre pour la deuxième longueur d'onde à 600 nm la concentration est inférieure et la gamme n'est pas linéaire.

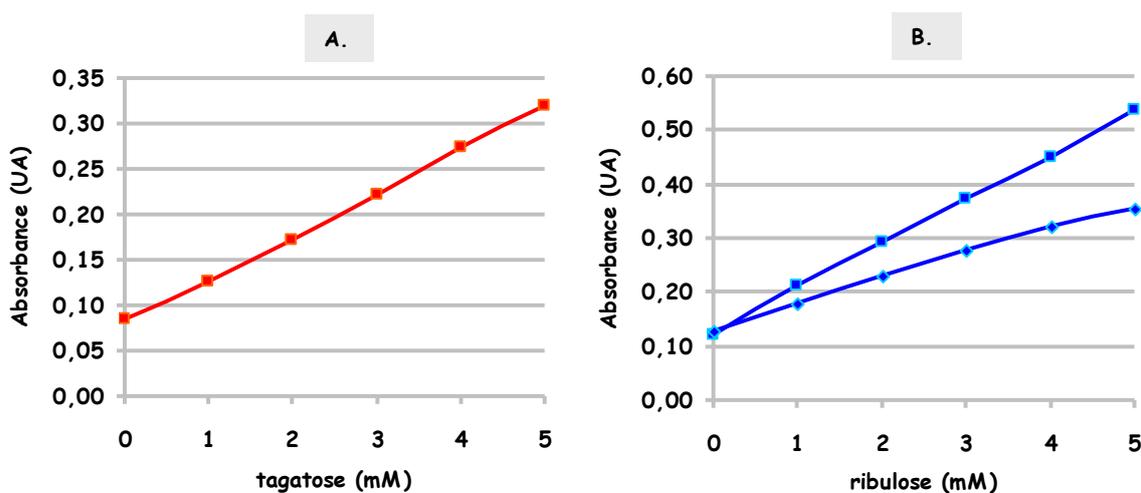


Figure 9 : Gamme étalon : A - D-tagatose. B - L-ribulose : (■) 535 nm - (◆) 600 nm.

B.3.4. Substances utilisées au cours des étapes de purification des enzymes

Au cours de la purification ou de la caractérisation d'enzymes, différentes solutions seront employées. Ces dernières peuvent causer des perturbations sur l'analyse dans certains cas, par conséquent nous avons examiné l'influence de ces composés sur le dosage afin de détecter à partir de quelles concentrations on obtient des interférences.

Les données montrées dans le [Tableau 1](#) sont les quantités des réactifs pour lesquels la concentration de ces produits causera une interférence sur la détection des cétooses. Cependant, ces quantités sont beaucoup plus élevées que celles utilisées à cette heure dans ces diverses étapes ainsi on peut considérer que l'on n'aura aucune interférence pendant la purification.

Excepté dans le cas du tampon PIPES (Piperazine-1,4-bis(2- acide ethanesulfonique)) qui présente une interférence à partir d'une molarité de 50 mM ce qui est plutôt faible, car il est employé le plus souvent avec des molarités de 100 mM. L'autre solution qui peut poser problème pendant l'analyse est le SDS (Sodium-dodécylsulfate) par exemple dans le cas d'une électroélution qui est effectuée avec un gel dénaturant c.-à-d. avec des concentrations élevées en SDS.

Tableau 1 : Interférences de différentes substances sur le dosage.

Substances	Interférence à partir de :
Acétone	20%
Ethanol	10%
Sulfate d'ammonium	2,5 M
NaCl	2 M
MES	1 M
MOPS	0,5 M
PIPES	50 mM
Phosphate	0,5 M
Tris-HCl	1 M
SDS	0,10%
Béta-mercaptoéthanol	0,50%
Triton X-100	2,50%
Guanidine-HCl	1M
EDTA	0,5 M
EGTA	0,5 M
Urée	2 M

B.4. Conclusion

Dans cette étude nous avons réalisé un protocole modifié à partir de la méthode de [Schenk et Bisswanger](#) pour la détection du xylulose et du fructose que nous avons adapté pour la détection des produits obtenus à partir de la L-arabinose isomérase purifiée de *L. bifermantans* [[Schenk et Bisswanger, 1998](#)]. Pour cela, nous avons d'abord vérifié que ces deux cétooses étaient effectivement détectables par ce procédé en réalisant un balayage UV, et nous avons ainsi pu déterminer que les longueurs d'ondes optimales de détection étaient de 535 nm pour le ribulose et 665 nm pour le D-tagatose alors que c'est 630 nm pour le D-xylulose et 490 nm pour le D-fructose. Après avoir adapté le dosage à nos conditions, nous avons réussi à détecter de faibles concentrations, environ 0,1 mM, en D-, L-ribulose ou en D-tagatose en présence de fortes concentrations d'aldoses, L-arabinose ou D-galactose, qui sont les substrats préférentiels de la L-arabinose isomérase [[Izumori et al., 1978](#); [Kim et al., 2002](#); [Lee et al., 2004](#)]. Sans que ces derniers ne provoquent une interférence sur le dosage pour des molarités de 200 mM et 100 mM respectivement pour l'arabinose et le galactose, alors que l'interférence apparaissait pour des concentrations en substrat supérieures à 10 mM dans le cas du xylose et du glucose selon le protocole de [Schenk et Bisswanger](#).

Cependant malgré cette optimisation, cette détection ne peut pas être réalisée sur des milieux complexes comportant plusieurs hydrates de carbone préférentiels de l'enzyme, en effet en présence de L-arabinose et de D-galactose le dosage sera possible et permettra d'observer si l'on a ou non action de l'enzyme, mais sans pouvoir déterminer la quantité de chaque isomère ceci en raison de l'interférence que chaque isomère causera sur l'autre. Par conséquent, cette méthode de dosage ne présente un intérêt que pour la détection des activités et la caractérisation des enzymes lors d'étapes de purification ou encore dans des procédés industriels de production de D-tagatose par exemple qui n'est réalisé qu'en présence de D-galactose.

C. Détermination de l'activité arabinose isomérase sur gel de polyacrylamide (PAA)

C.1. Détection de l'activité par découpage du gel

Dans cette partie diverses conditions de traitements de l'enzyme, natives et dénaturées et diverses conditions d'électrophorèses, natives et dénaturées ont été appliquées. Dans les conditions natives pour le gel de PAA et pour l'enzyme deux bandes ont été détectées et qui correspondent à la forme tétramère et dimère de la protéine [Lee *et al.*, 2005]. D'autre part en condition dénaturante seulement une bande a été détectée correspondant à la forme monomérique de la protéine à approximativement 55 kDa.

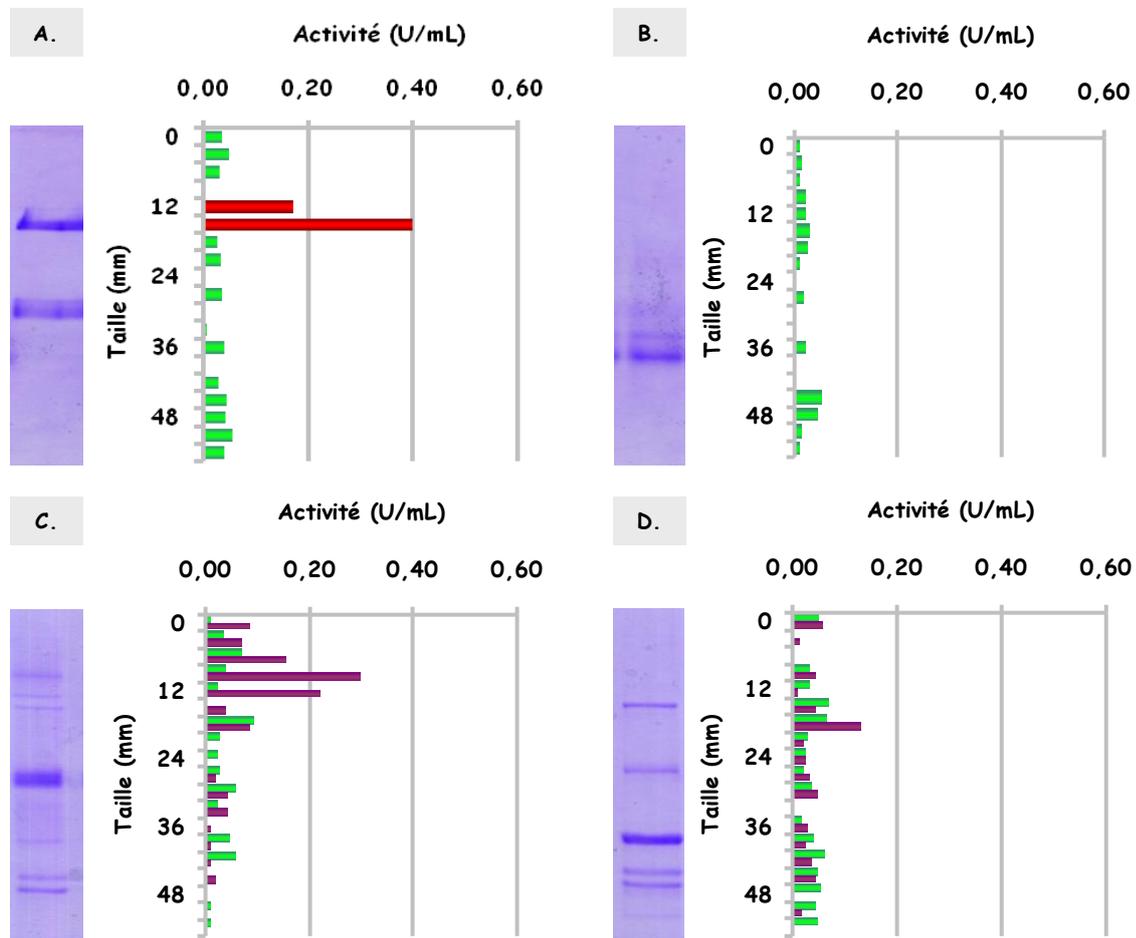


Figure 10 : profil de détection de l'activité AI par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min. Les bandes de gel de PAA sont incubées précédemment avec de l'arabinose 0,1 M et 10 mM Co²⁺ pendant 30 min à 60 °C. **A** - PAGE et enzyme native. **B** - PAGE et enzyme dénaturée. **C** - SDS-PAGE et enzyme native. **D** - SDS-PAGE et enzyme dénaturée.

L'activité n'est détectée qu'en condition native et au niveau de la protéine sous sa forme tétramérique. L'activité est également trouvée en condition semi-dénaturante c.-à-d. l'enzyme native migrant sur un gel en condition dénaturante. Cependant, l'activité n'est détectée dans ces conditions seulement après plusieurs bains des renaturations au Tris-HCl.

Dans un second temps, le gel est broyé afin d'examiner si cela nous permet de retrouver l'activité plus facilement. En comparant la [Figure 11](#) qui correspond au profil obtenu après broyage du gel et celle obtenue précédemment [Figure 10.A](#) on obtient 0,4 et 0,6 U/mL, respectivement. En conséquence, cette méthode nous permet d'améliorer le rendement de l'activité trouvé après migration. Ceci présente un intérêt pour la détection de ces activités dans le contenu intracellulaire alors que l'on a une activité faible.

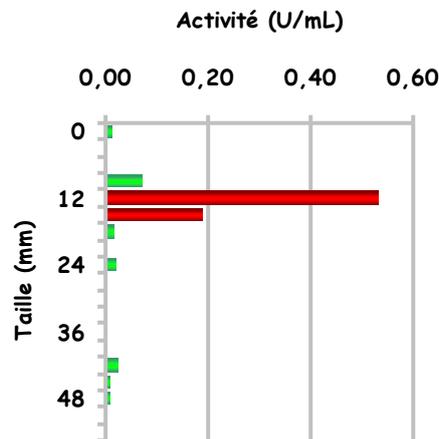


Figure 11 : profil de détection de l'activité AI par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min. Les bandes de gel de PAA sont broyées et incubées précédemment avec de l'arabinose 0,1 M et 10 mM Co^{2+} pendant 30 min à 60 °C.

Dans les mêmes conditions d'incubation et de quantité d'enzymes, nous avons cherché à observer l'effet du pourcentage d'acrylamide sur la détection de l'activité. La [Figure 12](#) montre que le meilleur pourcentage d'acrylamide dans le gel pour trouver l'activité est de 5,5%. Ceci peut être expliqué par le fait qu'avec un maillage faible l'enzyme a accès au substrat plus facilement.

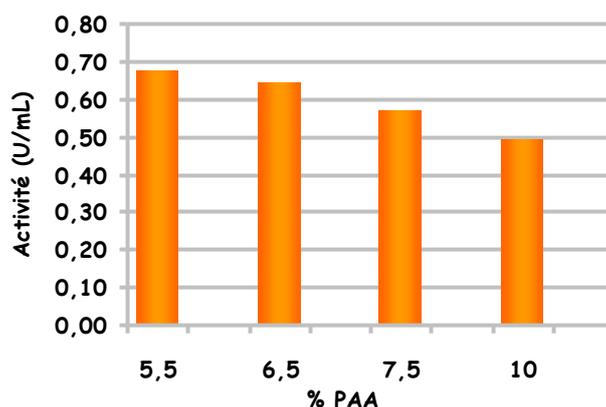


Figure 12 : Détection de l'activité selon le pourcentage d'acrylamide dans le gel d'électrophorèse par le test au résorcinol (voir Matériel et Méthodes) à 80 °C après 20 min. Les bandes de gel de PAA sont incubées précédemment avec de l'arabinose 0,1 M et 10 mM Co²⁺ pendant 30 min à 60 °C.

C.2. Détection de l'activité par la coloration au chlorure de triphenyltetrazolium

Dans cette partie nous décrivons l'adaptation de la réaction au formazan pour la détection du ribulose.

C.2.1. Effet des concentrations en NaOH ou en TTC sur la détection des cétooses sur le gel de PAA

Dans un premier temps, nous décrivons de nouvelles conditions à partir de la méthode au 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) [Gabriel et Wang, 1969 et Yamanaka, 1971] afin de déterminer les concentrations en NaOH et en TTC pour détecter rapidement de faible quantité de D-ribulose et de limiter l'interférence du L-arabinose. L'absorbance du formazan est mesurée à son maximum à 492 nm au spectrophotomètre.

Les concentrations de NaOH et de TTC pour lesquels on obtient l'interférence minimale de l'arabinose et la meilleure détection du ribulose sont de 0,5 N et 0,25%, respectivement. La Figure 13 montre la détection du ribulose et de l'arabinose à diverses molarités à partir des concentrations déterminées précédemment et on observe que l'interférence est vraiment très faible voir nulle par conséquent on peut se passer de l'étape de rinçage entre l'incubation avec le substrat et la révélation de l'activité. Ces concentrations seront employées pour la détection de l'activité pour les prochains essais.

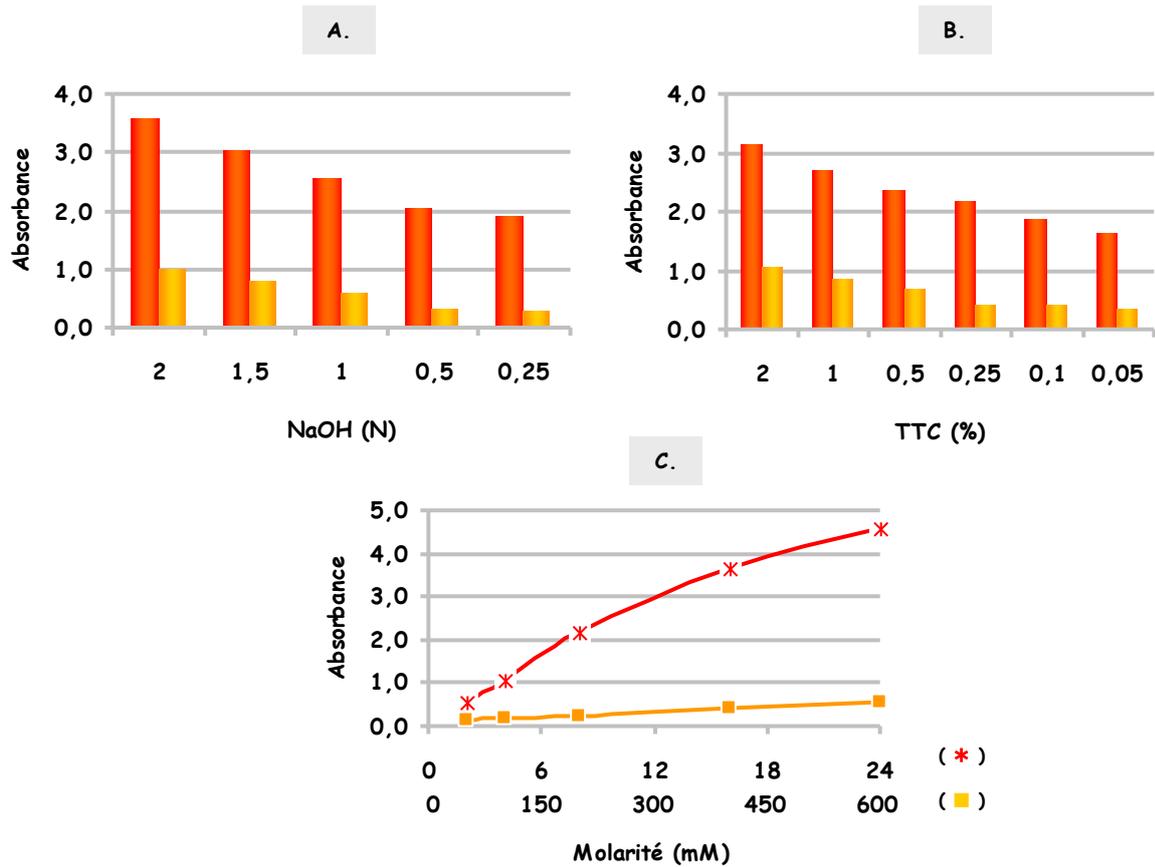


Figure 13 : Effet des différentes solutions de la coloration sur la détection des cétooses. **A** - Détection du ribulose (8 mM) (■) et de l'arabinose (400 mM) (■) avec TTC 1% et différentes molarités de NaOH. **B** - Détection du ribulose (8 mM) et de l'arabinose (400 mM) avec différents pourcentages de TTC et 0,5 N NaOH. **C** - Détection du ribulose (*) et de l'arabinose (■) à différentes molarités avec TTC 0,25% et 0,5 N NaOH.

C.2.2. Effet de la durée de l'incubation

Différents temps d'incubation avec l'arabinose ont été testés afin de déterminer la durée optimale pour observer le maximum d'activité. L'incubation est effectuée dans les conditions optimales de l'enzyme c.-à-d. à 60 °C et pH 7,5. Après la coloration une bande d'aspect rougeâtre est détectée pour le gel de PAA après une courte incubation de 30 s, mais l'intensité est maximale après 3 min d'incubation.

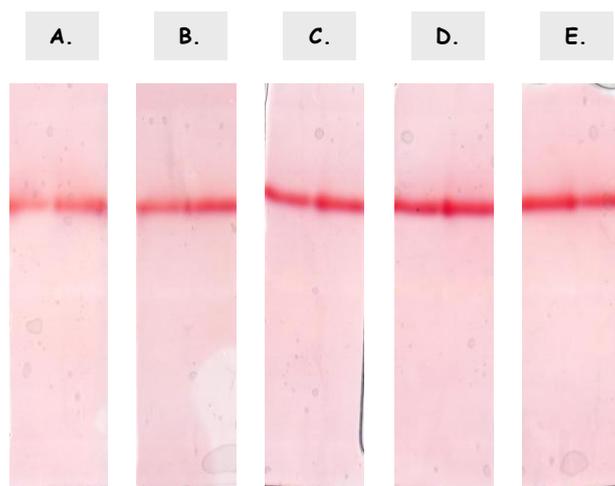


Figure 14 : Détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de *L. bif fermentans* à différents temps de coloration sur gel de PAA. Avec 0,25% de TTC et 0,5 N de NaOH. Le gel est préalablement incubé dans du Tris-HCl 50 mM, arabinose 1 M et Co^{2+} 10 mM pendant 3 min à 60 °C. **A** - 30 s **B** - 1 min **C** - 2 min **D** - 3 min **E** - 5 min.

C.2.3. Effet de la concentration en enzyme

Afin d'examiner la sensibilité de la méthode une série de dilution de l'enzyme L-arabinose isomérase est réalisée pour obtenir une gamme allant de 0 à 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et déposée sur le gel d'électrophorèse.

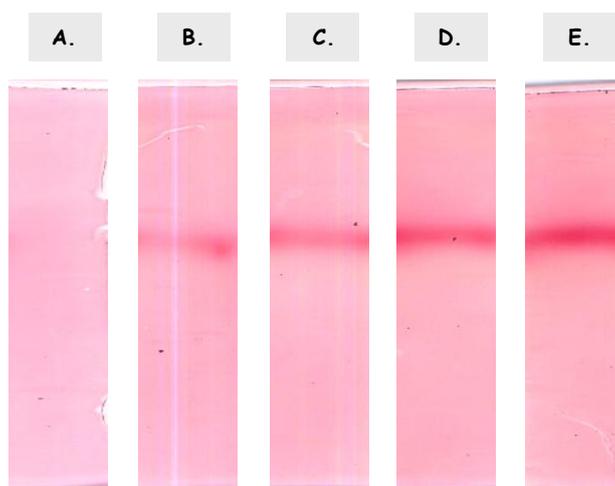


Figure 15 : Détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de *L. bif fermentans* à différentes concentrations sur gel de PAA. Avec 0,25% de TTC et 0,5 N de NaOH. Le gel est préalablement incubé dans du Tris-HCl 50 mM, arabinose 1 M et Co^{2+} 10 mM pendant 3 min à 60 °C. **A** - sans protéine. **B** - 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **C** - 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **D** - 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **E** - 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Les résultats démontrent que l'activité est détectée pour une concentration d'arabinose isomérase de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ par la coloration au TTC. L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide et facile à réaliser alors que normalement avec une telle concentration pour une coloration classique des protéines cela nécessite d'employer la technique au nitrate d'argent qui est longue et demande de nombreux produits.

Les essais suivants ont été effectués afin d'optimiser les paramètres utilisés pendant l'incubation du gel avec le substrat et afin de trouver des interférences possibles.

C.2.4. Effet de la concentration du substrat (L-arabinose)

L'effet de diverses quantités d'arabinose a été testé dans les conditions citées précédemment, il s'avère que la molarité la plus intéressante est 0,5 M. Des molarités plus importantes que 0,5 M tel que 0,75 et 1 M ont été également examinées, mais n'ont pas permis d'obtenir une intensité de réponse vis-à-vis de la bande rougeâtre plus importante (données non montrées).

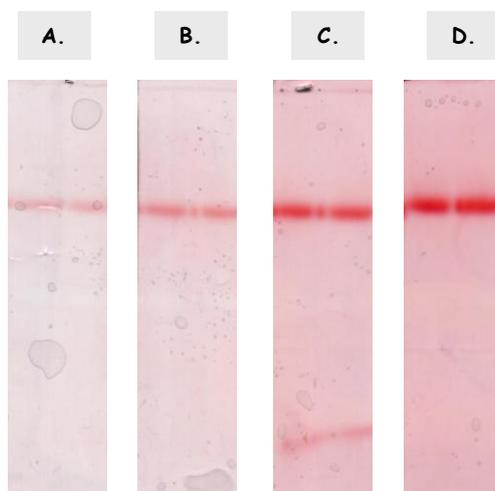


Figure 16 : Effet de la concentration en arabinose lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de *L. bifementans* sur gel de PAA. Avec 0,25% de TTC et 0,5 N de NaOH pendant 1 min. Le gel est préalablement incubé dans du Tris-HCl 50 mM, arabinose à différentes concentrations et Co^{2+} 10 mM pendant 3 min à 60 °C. **A** - 0,05 M arabinose. **B** - 0,1 M arabinose. **C** - 0,25 M arabinose. **D** - 0,5 M arabinose.

C.2.5. Effet du tampon sur la solution test

L'effet de différents tampons habituellement utilisés pendant la purification ou la conservation des protéines a été observé avec comme molarité 50 mM. Les résultats obtenus sur la Figure 17 montrent que le tampon MOPS présente une interférence très importante sur la coloration et ainsi ne permet pas de détecter l'activité. Pour les autres tampons, l'activité est détectée avec cependant quelques différences dans les intensités et par conséquent au niveau de l'activité, particulièrement dans le cas de la solution tampon de phosphate.

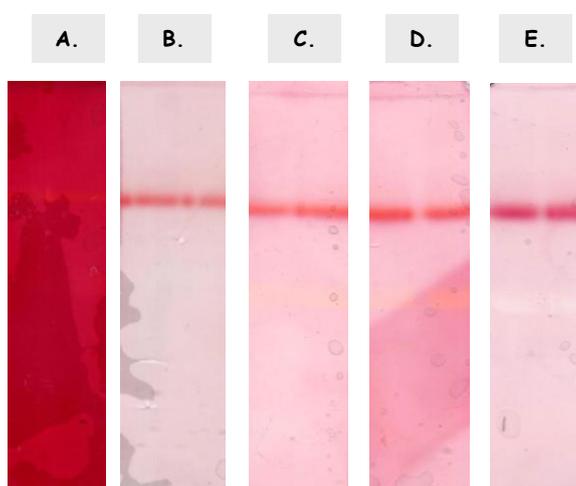


Figure 17 : Effet de tampon utilisé lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de *L. bif fermentans* sur gel de PAA. Avec 0,25 % de TTC et 0,5 N de NaOH pendant 1 min. Le gel est préalablement incubé dans différents tampons à 50 mM, arabinose 1 M et Co^{2+} 10 mM pendant 3 min à 60°C. **A** - MOPS 50 mM. **B** - Phosphate buffer 50 mM. **C** - MES 50 mM. **D** - PIPES 50 mM. **E** - Tris/HCl 50 mM.

C.2.6. Effet des ions utilisés avec l'arabinose

En dernier lieu, nous avons étudié l'effet de divers ions bivalents à une molarité de 10 mM, connus comme étant activateur ou inhibiteur de l'arabinose isomérase [Banerjee *et al.*, 1995 ; Yamanaka, 1975 ; Patrick et Lee, 1975]. En présence de Co^{2+} , de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} l'activité est stimulée réellement tandis qu'aucune activité n'est détectée dans le cas du gel incubé sans ions. Dans le cas de Zn^{2+} l'enzyme n'est pas activée cependant ce protocole ne permet pas de déterminer si l'ion inhibe l'enzyme. De plus en ce qui concerne l'ion Ca^{2+} il cause une interférence sur la coloration de ce fait l'intensité rougeâtre de la bande n'est pas détectable.

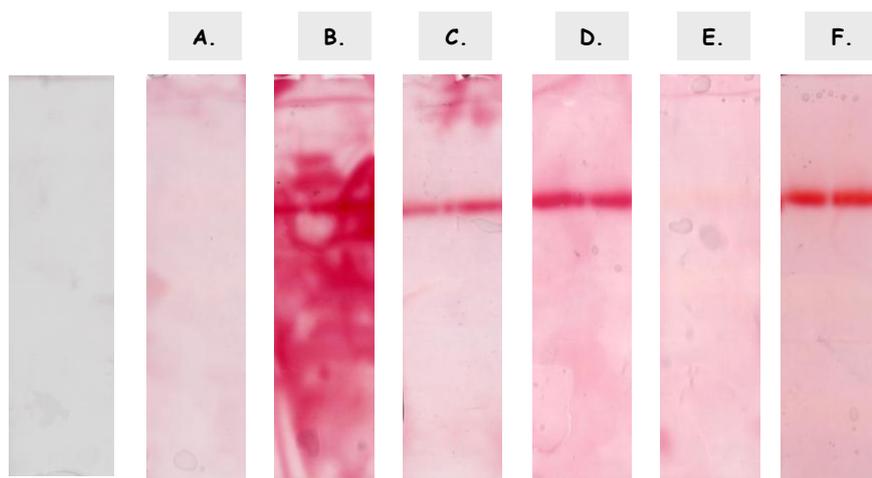


Figure 18 : Effet de différents ions utilisés lors de l'incubation sur la détection au TTC de l'activité arabinose isomérase de *L. bif fermentans* sur gel de PAA. Avec 0,25 % de TTC et 0,5 N de NaOH. Le gel est préalablement incubé dans du Tris-HCl 50 mM, arabinose 1 M et divers ions à 10 mM pendant 3 min à 60°C. **A** - sans ions. **B** - Ca²⁺ 10 mM. **C** - Mg²⁺ 10 mM. **D** - Mn²⁺ 10 mM. **E** - Zn²⁺ 10 mM. **F** - Co²⁺ 10 mM.

C.3. Conclusion

Au niveau de la détection sur gel de PAA de l'activité L-arabinose isomérase, chaque méthode présente ses inconvénients et ses avantages selon l'utilisation que l'on veut en faire. Les deux méthodes ont des points communs, car l'activité n'est détectée que dans les conditions natives d'électrophorèse et sous sa forme tétramérique. D'autre part plus le pourcentage d'acrylamide est faible plus l'activité est facilement discernable (données non montrées pour TTC). Pour la détection sur gel de PAA en condition dénaturante, l'activité ne va pouvoir être détectée que par renaturation du gel ce qui va permettre à l'enzyme de retrouver sa forme native par élimination du SDS et autres produits dénaturants. Mais cette renaturation exige un traitement lourd et ne permet pas de recouvrer toute l'activité [Gabriel et Gersten, 1992] ou la protéine doit être éluée par dialyse et l'éluant passé sur résine d'échange anionique [Brysk *et al.*, 1988].

La méthode au TTC a l'avantage d'être simple, rapide et s'applique sans traitement du gel. Cependant, l'inconvénient est que la détection de l'activité est simplement qualitative et permet seulement d'avoir une caractérisation partielle de l'enzyme par exemple pour la détermination des ions activateurs, mais pas inhibiteurs. Une évaluation semi-quantitative de l'activité a été décrite par Gabriel et Wang [1969], mais présente de nombreux inconvénients tels que l'utilisation de toluènes et la réaction du TTC avec l'acrylamide quand on chauffe. De plus au

moment de la coloration des interférences sont détectées comme avec le tampon MOPS ou l'ion Ca^{2+} . Ces interférences ne sont pas trouvées dans le cas de la détection par la méthode modifiée de Schenk et de Bisswanger [[Schenk et Bisswanger, 1998](#)].

L'inconvénient principal de la deuxième méthode est la durée du protocole. En effet le gel de PAA doit être coupé ensuite incubé une demi-heure pour finir sur le dosage qui dure 20 min tandis que dans le cas de la méthode au TTC le résultat est obtenu au bout de 5 min. Cependant avec ce procédé on peut déterminer l'activité (U/mL) et l'activité spécifique (U/mg) de l'enzyme. Un des autres avantages est que l'enzyme ne subit pas les effets de la détection de l'activité tandis que pour la révélation au TTC le gel est placé dans des conditions nocives telles que la NaOH ou l'acide pour arrêter la coloration.

D. Séparation et détermination par C.L.H.P.

D.1. Détermination des temps de rétention à partir de différentes colonnes

Les colonnes testées sont celles qui sont employées habituellement pour la détection des isomères après isomérisation des glucides simples telles que la colonne Aminex HPX-87P [Pastinen *et al.*, 1999 ; Jokela *et al.*, 2002], ou pour la détermination des métabolites pendant la fermentation avec l'Aminex HPX-87H [Jeppsson *et al.*, 1996 ; Kuyper *et al.*, 2005], l'Aminex 42A. Les résultats obtenus sont montrés dans le [Tableau 2](#).

Tableau 2 : Temps de rétention des étalons sur différentes colonnes. Le débit est de 0,6 mL/min avec les éluants respectifs à chaque colonne et détection par réfractomètre.

Colonnes	Eluant	Carbohydrates					
		Arabinose	Glucose	Xylose	Ribulose	Fructose	Xylulose
Aminex-HPX 87H	5mM H ₂ SO ₄	11'330	9'625	10'473	11'428	10'226	10'879
Aminex-HPX 87P	H ₂ O	17'574	13'886	15'047	ND(*)	19'160	18'102
Aminex-HPX 42A	H ₂ O	18'145	16'440	16'451	17'930	17'403	16'839
Supelcosil®	75% CH ₃ N	15'908	18'290	14'741	13'359	16'610	13'453

(*) ND : Pas de détection

L'analyse des mélanges d'arabinose et de ribulose a déjà été décrite en utilisant une colonne Aminex HPX-87P [Pastinen *et al.*, 1999]. Cependant dans nos conditions sur la colonne Aminex HPX-87P, le ribulose n'est pas détecté. Selon De Muyneck *et al.* [2005] ceci serait la conséquence de la dégradation du ribulose à des températures élevées de colonne, mais également dû à l'environnement plutôt acide de la colonne.

Pour les colonnes Aminex HPX-42A et Supelcosil® quelques hydrates de carbone ne sont pas séparés il s'agit respectivement du glucose-xylose et du ribulose-xylulose. Ainsi pour la suite de l'étude nous avons conservé la colonne Aminex HPX-87H qui présente une séparation de tous les composants.

D.2. Influence de la phase mobile sur la détection des pics et les temps de rétention

Plusieurs phases mobiles avec diverses molarités d'acide sulfurique s'étendant de 1 à 5 mM ont été examinées. La teneur en acide sulfurique n'a eu aucune influence sur la période de séparation et de conservation de l'hydrate de carbone comparée au profil obtenu avec l'eau MilliQ [Figure 19]. Cependant, la détection par U.V. avec l'acide sulfurique en tant que phase mobile ne permet pas de détecter les cétooses tels que le ribulose ou le xylulose. En effet, la longueur d'onde comprise entre 210 et 254 nm est celle utilisée pour la détermination des acides en C.L.H.P. [Yuan et Chen, 1999] et par conséquent l'acide sulfurique cause des interférences sur la détection.

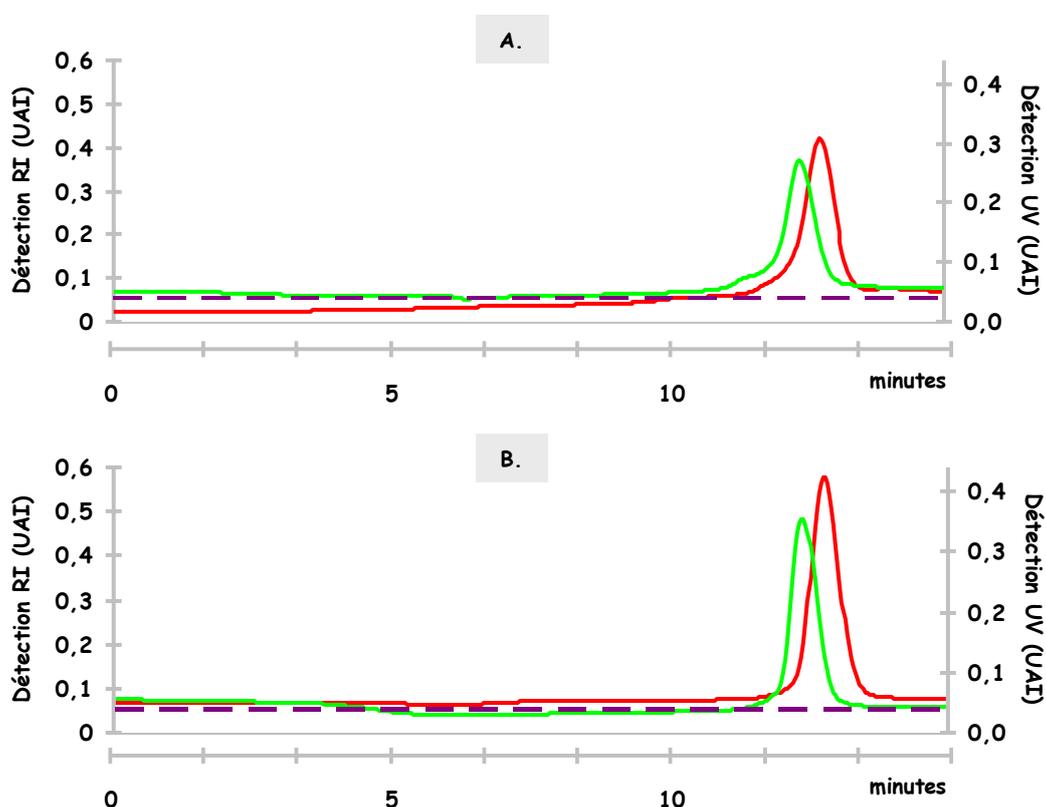


Figure 19 : Détection du L-ribulose et du D-xylulose (5 g/L) sur colonne Aminex HPX-87H avec différents éluants : eau MilliQ et 5 mM H₂SO₄ **A** - L-ribulose - **B** - D-xylulose. Détection RI (sensibilité 32) (—) et détection U.V. à 210 nm : eau (—) et 5 mM H₂SO₄ (---) à 65 °C.

D.3. Détermination de la longueur d'onde pour la détection des cétooses

Différentes longueurs d'onde comprises entre 190 et 220 nm ont été examinées avec comme phase mobile l'eau MilliQ pour un débit de 0,6 mL/min [Figure 20].

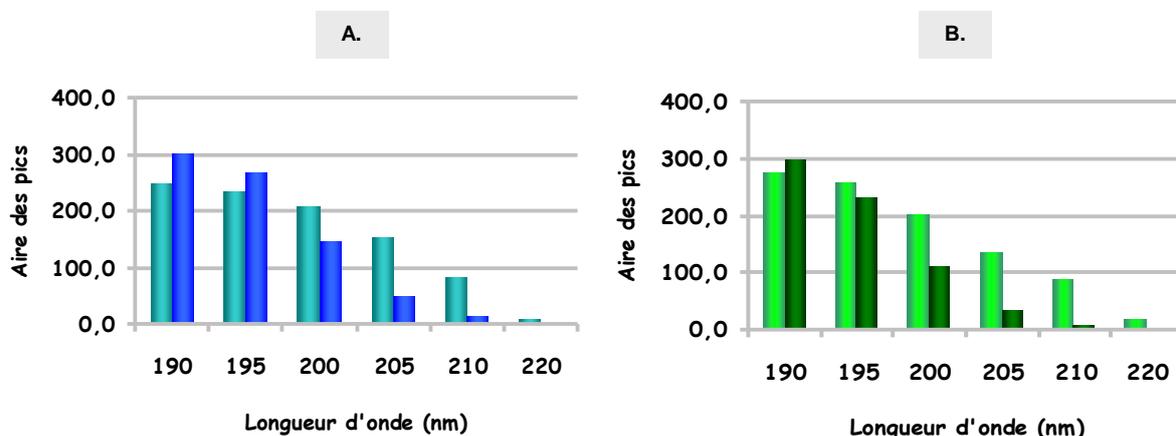


Figure 20 : Détermination de la surface des pics pour les pentoses et les cétooses correspondants selon différentes longueurs d'ondes A - L-arabinose (■) et L-ribulose (■) B - D-xylose (■) et D-xylulose (■).

Les résultats montrent que la détection des cétooses tels que le L-ribulose et le D-xylulose est faible pour une longueur d'onde de 220 nm. D'ailleurs, la réduction de la longueur d'onde permet d'augmenter la sensibilité de la détection et ainsi la surface des pics détectés. Cependant en ce qui concerne l'interférence des aldoses elle est faible entre 205 et 210 nm mais devient de plus en plus importante entre 190 et 200 nm par rapport aux cétooses.

L'augmentation de l'interférence est due au fait que plus on s'éloigne de la zone de longueur d'onde comprise entre 205-210 nm moins la détection de la liaison cétonique portée par le deuxième atome de carbone (C2) est spécifique au contraire plus on détectera les aldo-hydrates de carbone par conséquent les groupes hydroxyles.

D.4. Influence de la température sur le temps de rétention et la surface des pics

L'effet de la température s'étendant de 25 à 85 °C a été testé en employant l'eau MilliQ en tant que phase mobile avec un débit de 0,6 mL/min. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la température provoque des changements sur le temps de rétention des cétooses. Cependant, cet effet est différent selon le cétoose concerné dans le cas du L-ribulose

nous observons une réduction alors que pour le temps de rétention du D-xylulose il augmente [Figure 21.B].

Au contraire, la température présente un effet comparable sur l'aire des pics du xylulose et du ribulose avec une augmentation correspondant à une augmentation de la température de 25 à 55 °C. Alors qu'ensuite une augmentation plus importante de la température diminue légèrement la surface des pics détectés.

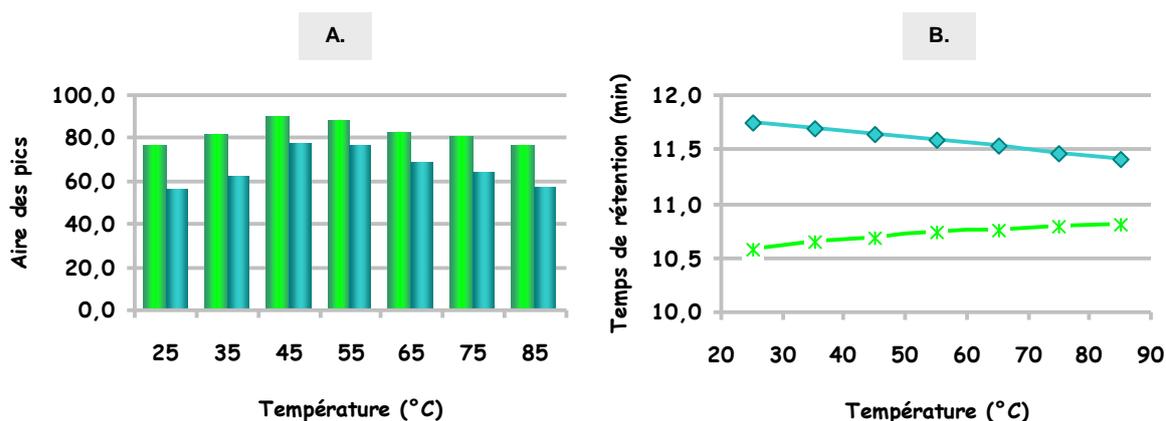


Figure 21 : Influence de la température sur l'aire des pics et le temps de rétention des cétooses par détection UV à 210 nm. **A** - Aire des pics du L-ribulose (■) et du D-xylulose (■) à 2,5 g/L. **B** - Temps de rétention du L-ribulose (◆) et du D-xylulose (*). (n = 4 pour chaque sucre et chaque concentration).

Pour la suite de l'étude nous avons conservé la température de 45 °C pour laquelle il est possible d'obtenir la meilleure détection des cétooses et d'augmenter sensiblement l'intervalle entre les pics, comparée à la température de 65 °C.

D.5. Validation de la méthode

D.5.1. Linéarités

Le linéarité entre les concentrations des glucides (ribulose et xylulose), l'indice de réfraction (sensibilité 16) et la surface des pics (210 nm) par détection UV a été déterminé dans l'eau MilliQ à 0,6 mL/min [Figure 22]. Quatre essais sont effectués pour chaque glucide et chaque concentration allant de 0,5 à 10 g/L. Par contre, des concentrations plus élevées (> 15 g/L) ont eu comme conséquence la déformation des pics (données non montrées).

Les coefficients de corrélation des graphiques de calibration étaient 0,9995 pour le ribulose et 0,9997 pour le xylulose. De plus, les limites de détection pour le cétose sont 0,2 g/L pour le D-xylulose et 0,4 g/L pour le L-ribulose.

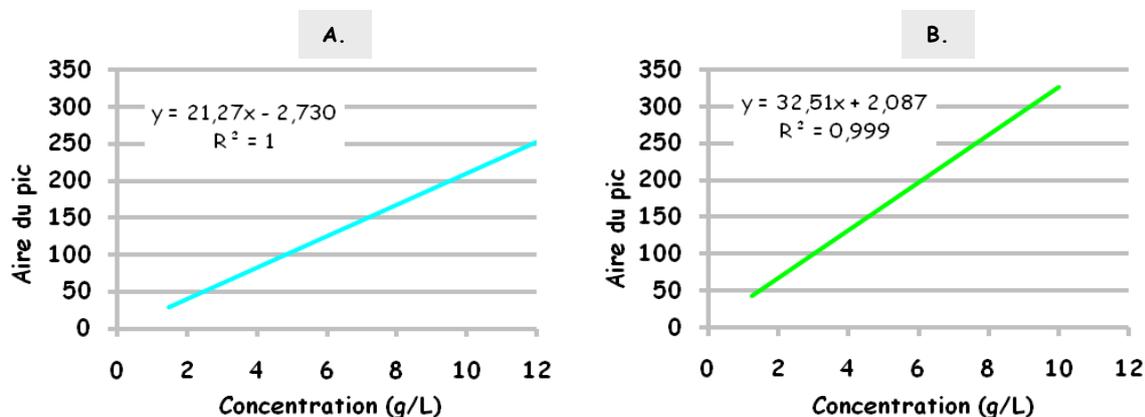


Figure 22 : Gamme étalon : A - L-ribulose et B - D-xylulose par détection UV à 210 nm entre 1 et 12 ou 10 g/L, respectivement.

D.5.2. Précision

Nous avons constaté que la résolution par détection UV à 210 nm est constante et stable indépendamment des temps de fonctionnement ou du nombre d'échantillons.

Tableau 3 : Variabilité des temps de rétention.

Composants	Temps de rétention ^a			
	Moyenne (min)		RSD ^b (%)	
	Détection UV	Détection RI	Détection UV	Détection RI
glucose	ND ^c	9'833		1,28
xylose	ND	10'583		0,56
xylulose	10'679	11'035	0,69	0,72
arabinose	ND	11'533		0,85
ribulose	11'629	11'898	0,32	0,31

^a : Calculé sur la base de 4 analyses de 1, 2, 5 et 10 g/L à partir de solutions standards.

^b : RSD: deviation standard relative.

^c : ND : pas de détection.

D.5.3. Interférences

Nous avons cherché à déterminer à partir de quelles concentrations en aldo-pentose nous obtenons une interférence par détection UV à 210 nm [Figure 23]. Malgré le fait que les aldoses sont plus stables sous la forme pyranose, il y a un équilibre et par conséquent une forme furanose et surtout linéaire, qui peut être discernable.

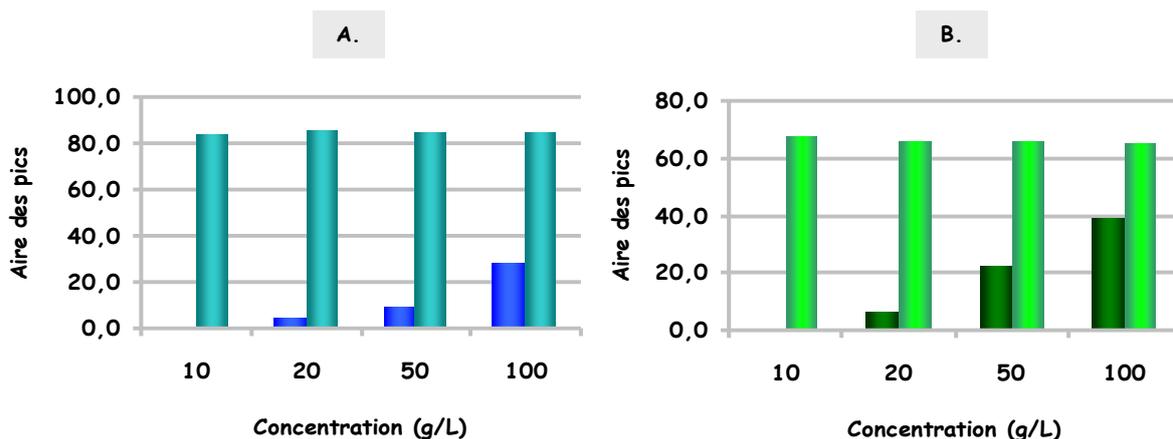


Figure 23 : Influence de la concentration en aldose dans le milieu sur la surface des pics des cétooses correspondants par détection UV à 210 nm. **A** - L-arabinose (■) et L-ribulose (■) **B** - D-xylose (■) et D-xylulose (■). (n = 4 pour chaque sucre et concentration)

Les résultats indiquent que pour une concentration de 50 g/L en aldose on observe l'apparition d'un pic qui va donc interférer sur la détermination de la surface des pics des cétooses particulièrement dans le cas du xylose.

D.6. Détermination des cétooses dans le sirop de son de blé

Pour finir nous avons cherché à détecter la présence des concentrations faibles des cétooses contenus dans un mélange avec des concentrations élevées d'aldo-hexoses et d'aldopentoses. Pour cela, nous avons ajouté du ribulose et du xylulose, chacun à une concentration de 2 g/L, avec le sirop de son de blé à une concentration finale de 100 g/L en glucides.

Les composants du sirop de son de blé ont été déterminés par détection RI pour les aldoses tels que le D-glucose, le D-xylose et le L-arabinose et par détection UV pour le L-ribulose et le D-xylulose [Figure 24]. Nous avons utilisé la méthode décrite précédemment c.-à-d. l'eau MilliQ comme éluant avec un débit de 0,6 mL/min et pour une température de 45 °C.

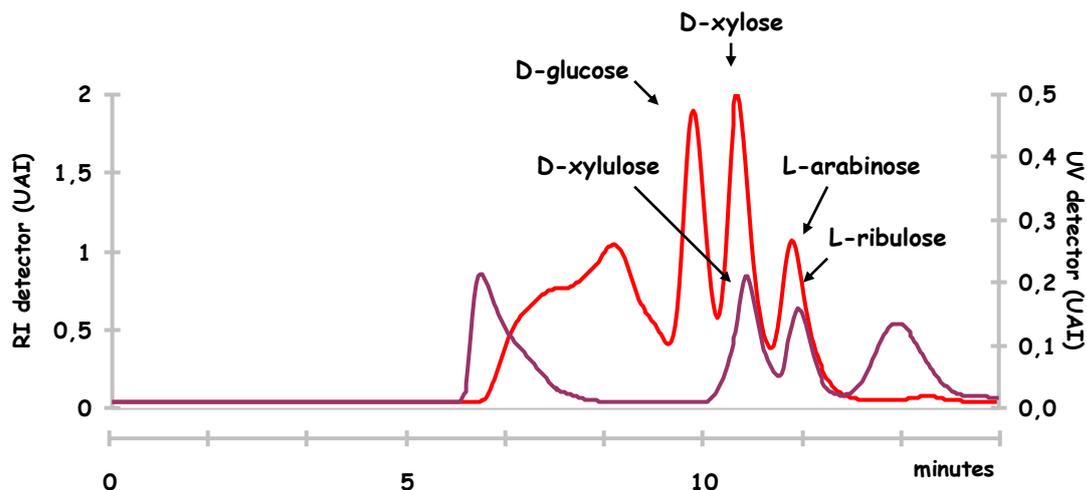


Figure 24 : Profil de séparation des glucides du sirop de son de blé (100 g/L) et du L-ribulose et D-xylulose (2 g/L) sur une colonne Aminex HPX-87H à 45 °C avec de l'eau MilliQ pour un débit de 0,6 mL/min. Détection RI à sensibilité 32 (—) et détection UV à 210 nm (—).

Les pourcentages de détection du ribulose et du xylulose sont de 93,1% et 96,3 % avec RSD de 3,1% et de 2,95% respectivement. Les résultats obtenus montrent que la méthode utilisant les UV pour la détection et la quantification des cétooses est stable et est adaptée pour l'analyse des concentrations faibles en présence des quantités élevées d'hydrates de carbone.

D.7. Conclusion

La méthode décrite dans ce chapitre présente une technique rapide, précise et spécifique pour la détection de basses concentrations de cétooses en sirops complexes contenant des concentrations élevées d'hydrates de carbone tels que le glucose et les pentoses. Ainsi dans cette étude nous avons pu détecter de petites quantités de cétooses obtenus par le processus d'isomérisation et de fermentation simultanée des pentoses par utilisation des isomérases. Les aldoses et les cétooses ont été détectés et analysés simultanément dans la même expérience ce qui n'est pas possible avec des dosages traditionnels des cétooses qui ne permettent de quantifier seulement un cétoose dans un milieu simple contenant un aldose. Avec cette méthode, le niveau d'isomérisation et la détermination de chaque composant individuel du mélange sont obtenus. De plus, le temps du protocole est plus court qu'avec les autres procédés de dosage par la méthode de [Schenk et Bisswanger \[Schenk et Bisswanger, 1998\]](#).

Résultats et Discussion : Isomérases

A. Introduction et hypothèse de travail

Une voie d'utilisation des sucres en C5 et notamment du xylose comme substrat de fermentation est l'isomérisation des sucres afin de les rendre utilisables pour la cellule, notamment utilisée dans la production d'éthanol. Ainsi, la transformation du xylose en xylulose via une xylose isomérase permet de transformer un sucre non assimilable par un micro-organisme fongique en molécule facilement métabolisable en éthanol. Ce procédé de transformation du xylose pourrait être également mis en œuvre vis-à-vis de l'arabinose en le transformant en ribulose, afin de le rendre assimilable par des microorganismes, et ce, même si la voie d'utilisation de ce dernier est plus complexe que le xylose. Un autre intérêt non négligeable pour ces deux enzymes que sont la L-arabinose isomérase et la D-xylose isomérase est l'importance qu'elles ont au niveau industriel [\[voir Chapitre 1\]](#).

Dans ce chapitre nous avons décidé de purifier la L-arabinose isomérase et la D-xylose isomérase à partir de la bactérie lactique *L. bifementans*, en effet ces deux enzymes, qui catalysent la première étape de transformation de l'arabinose et du xylose, doivent être présentes dans cette souche à la vue de l'utilisation et de la vitesse de consommation des pentoses lors de la fermentation lactique. Après un criblage de ces activités par rapport à d'autres souches du genre *Lactobacillus*, nous les produirons en fermenteur afin de les purifier et de les caractériser. Dans la dernière partie de ce travail, après amélioration des conditions de culture et de production de ces enzymes, nous chercherons à immobiliser ces deux activités ensembles soit sous la forme de cellule entière soit les enzymes purifiées afin de caractériser les activités retrouvées après immobilisation sur les différents substrats.

B. Purification et caractérisation des activités isomérases

B.1. Criblage de *Lactobacillus* et mise en évidence des activités isomérases

Au vu de l'utilisation des pentoses par la souche *L. bifermentans*, nous avons décidé de purifier les enzymes L-arabinose isomérase (AI) et D-xylose isomérase (XI). Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude préliminaire de ces deux activités par dosage sur extrait brut et en les comparants avec d'autres souches hétérofermentaires du genre *Lactobacillus*.

Tableau 1 : Criblage des activités isomérases chez les souches du genre *Lactobacillus*. Observation de la croissance cellulaire, consommation des sucres et activité des isomérases après 16 h de culture sur milieu MRS contenant de l'arabinose ou du xylose (10 g/L).

souches	Arabinose			Xylose		
	croissance (A600nm)	consommation glucides (%)	Activité enzymatique (U/mL)	croissance (A600nm)	consommation glucides (%)	Activité enzymatique (U/mL)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1,8766	89	2,15	1,8556	77	1,54
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,9006	87	2,08	1,722	57	0,67
<i>Lactobacillus bifermentans</i>	2,3843	88	2,37	1,8188	76	1,52
<i>Lactobacillus curvatus</i>	0,5987	66	0,93	0,6239	60	0,45
<i>Lactobacillus casei</i>	1,0217	78	1,01	0,6665	50	0,19

Les résultats obtenus présentés dans le [Tableau 1](#) montrent que *L. bifermentans* présente effectivement les deux activités et qu'avec *L. pentosus* cette production est la plus élevée.

B.2. Purification des activités isomérases

B.2.1. Protocole

Afin de purifier les activités AI et XI, nous avons réaliser des fermenteurs grands volumes (160 L) à 35 °C sur le milieu MRS complémenté avec de l'arabinose ou du xylose à 5 g/L. Le pH du milieu est régulé à 7,0 et une agitation de 150 rpm est réalisée, les cultures ont été

arrêtées en fin de phase exponentielle après 6 h de cultures. L'extrait brut intracellulaire a ensuite été récupéré selon le protocole décrit Figure 1 et va être utilisé pour la purification des enzymes.

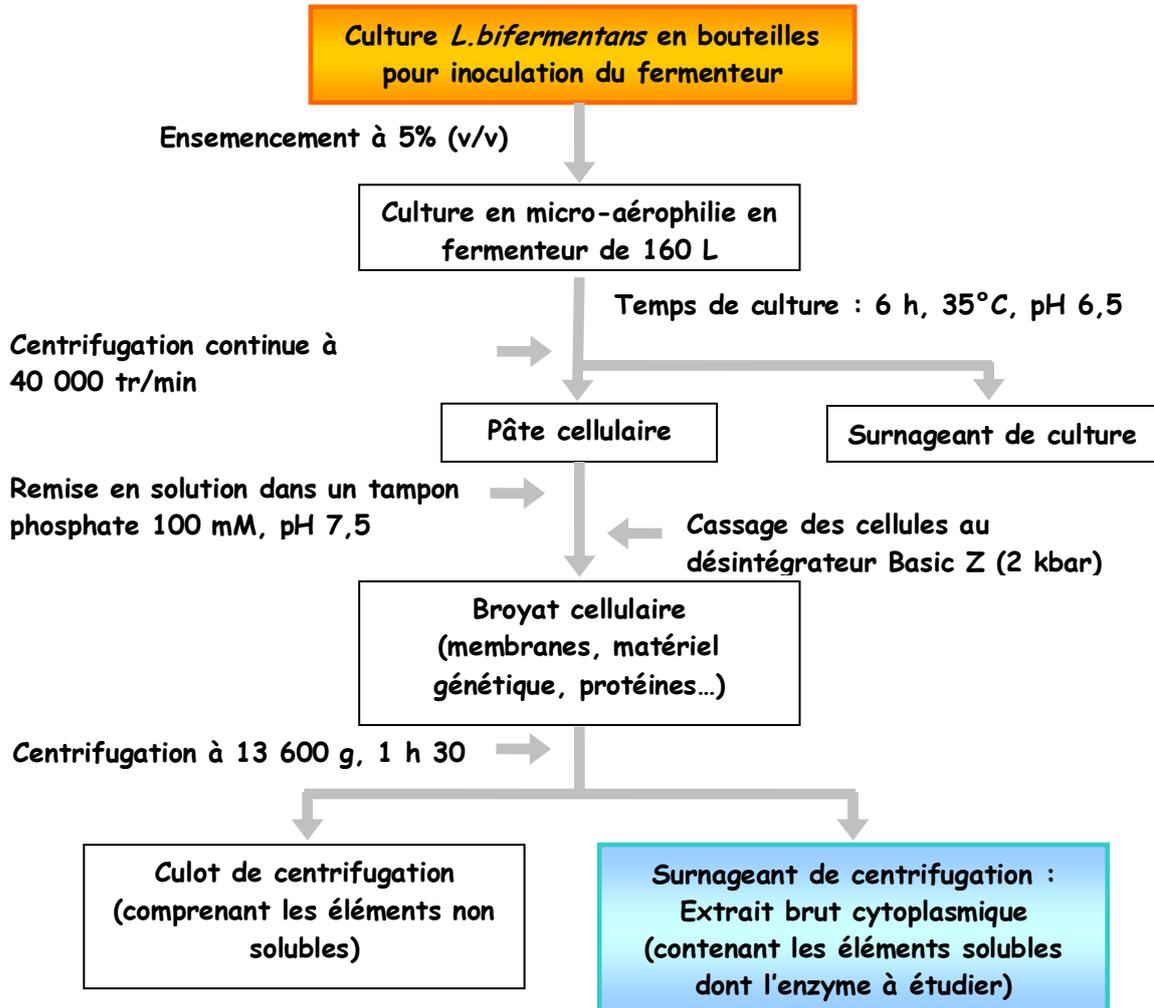


Figure 1 : Protocole d'obtention d'un extrait brut cytoplasmique à partir d'une culture en gros volume.

B.2.2. Xylose isomérase (XI)

- **Étapes de précipitations**

Les différents essais de précipitations ont été réalisés à partir du contenu intracellulaire obtenu à partir de la culture de *L. bif fermentans* sur xylose. L'extrait brut est ensuite filtré, dialysé et présente une concentration en protéines de 7,6 mg/mL pour une activité isomérase de 0,49 U/mL.

Tableau 2 : Essais de précipitations sur l'activité xylose isomérase.

	%	20	30	40	50	60	70	80
Sulfate d' Ammonium	Protéines (mg/mL)	0,90	1,00	1,20	2,40	4,30	6,00	6,80
	Activité (U/mL)	0,13	0,14	0,16	0,22	0,27	0,32	0,35
	AS (U/mg)	0,14	0,14	0,13	0,09	0,06	0,05	0,05
Éthanol	Protéines (mg/mL)	0,90	0,90	0,90	0,50	0,90	0,80	0,50
	Activité (U/mL)	0,19	0,23	0,24	0,11	0,06	0,03	0,02
	AS (U/mg)	0,21	0,25	0,26	0,22	0,06	0,04	0,04
Acétone	Protéines (mg/mL)	0,40	0,60	0,80	1,00	1,70	1,30	0,90
	Activité (U/mL)	0,11	0,20	0,26	0,35	0,18	0,12	0,06
	AS (U/mg)	0,28	0,33	0,33	0,35	0,11	0,09	0,06

Les résultats obtenus montrent que la précipitation à l'éthanol inhibe l'activité de la xylose isomérase et permet également une moins bonne précipitation. En ce qui concerne la précipitation à l'acétone, on retrouve le plus d'activité avec 50% et pour le sulfate d'ammonium à 80%. Cependant, l'activité spécifique est plus intéressante dans le cas de la précipitation à l'acétone.

▪ La chromatographie liquide échangeuse d'ions

Le surnageant de précipitation est filtré et dialysé avant d'être déposé en plusieurs fois sur une colonne échangeuse d'ions avec un gel Q-sepharose. Les protéines ont été éluées grâce à un gradient de sel préparé dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contenant du NaCl (1 M) [Figure 2]. D'après ces résultats, on observe que l'on retrouve le pic d'activité pour un volume d'éluion de 2710 à 3115 mL (tubes 165 à 185 sur le profil), ce qui correspond à un pourcentage de NaCl d'environ 50%.

▪ La chromatographie par tamisage moléculaire

Les fractions contenant la xylose isomérase sont regroupées, concentrées et ultrafiltrées sur une membrane de 10 kda avec un tampon phosphate 100 mM pH 7,0. La fraction enzymatique recueillie est déposée sur colonne Sephacryl S-200 en plusieurs fois et les protéines éluées sont récoltées en fraction de 1,5 mL [Figure 2]. Suite au dosage, l'activité a été détectée dans les tubes 122 à 132, avec le maximum d'activité pour un volume d'éluion de

128 mL. En plus de la purification de l'enzyme grâce à cette méthode nous avons pu déterminer sa masse moléculaire à partir de la calibration faite sur la colonne, l'enzyme native possède une masse d'environ 212 kDa \pm 7 kDa [Annexe 3]. Cette masse est un peu plus élevée que celles trouvées pour d'autres XI avec une masse comprise entre 180 et 200 kDa, cependant elles n'ont pas été purifiées chez des souches du genre *Lactobacillus* [Vieille *et al.*, 2001 ; Joo *et al.*, 2005 ; Kawai *et al.*, 1994 ; Lama *et al.*, 2001].

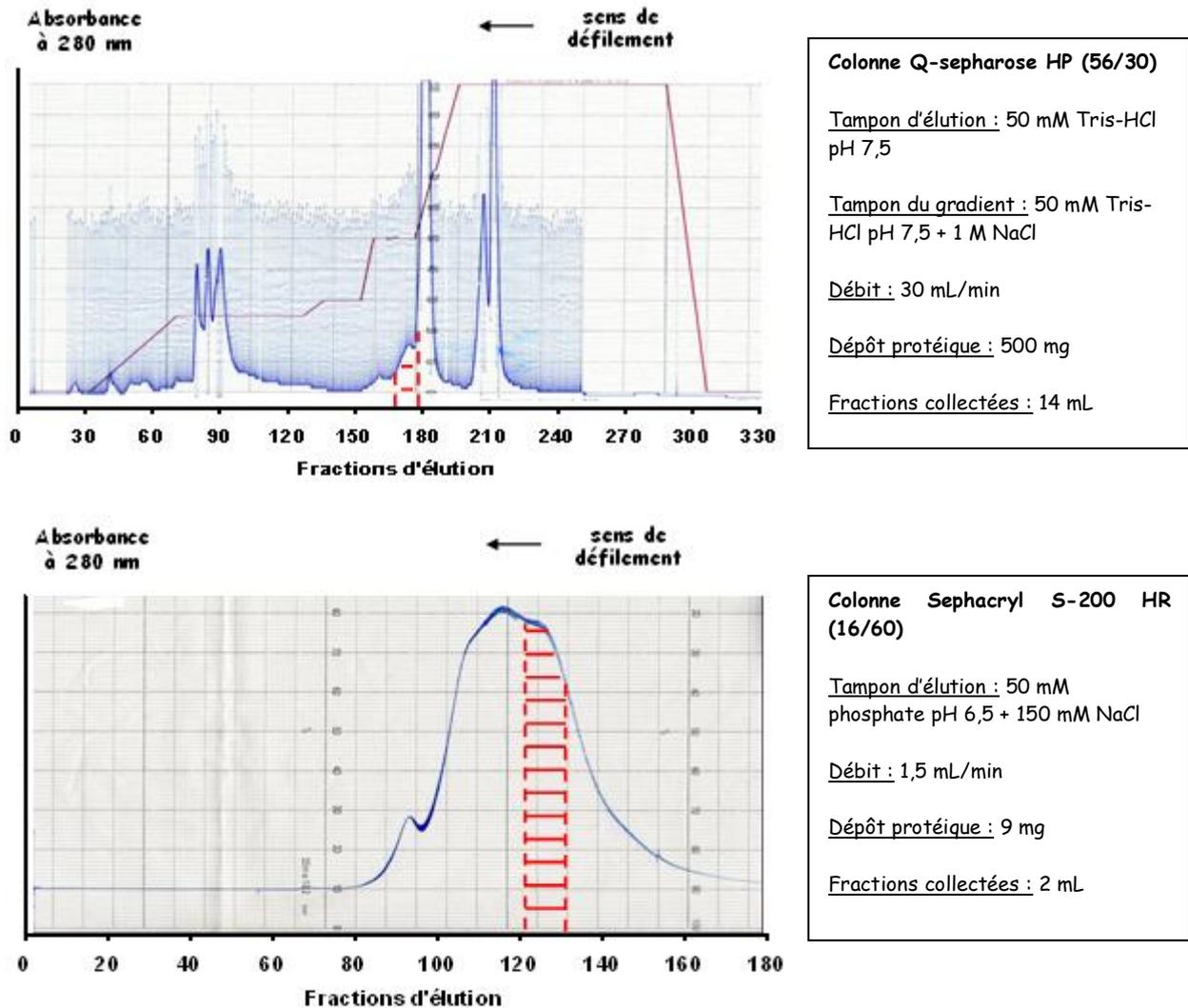


Figure 2 : Purification de l'activité xylose isomérase de *L. bifementans* par chromatographie échangeuse d'ions et par chromatographie d'exclusion. Détection activité (■).

B.2.3. Arabinose isomérase

- **Étapes de précipitations**

Les différents essais de précipitations ont été réalisés à partir du contenu intracellulaire obtenu à partir de la culture de *L. bifermantans* sur arabinose. L'extrait brut est traité avec la même méthode que pour la xylose isomérase et on obtient une concentration en protéines de 6,3 mg/mL pour une activité isomérase de 2,23 U/mL.

Tableau 3 : Essais de précipitations sur l'activité arabinose isomérase.

	%	20	30	40	50	60	70	80
Sulfate d'Ammonium	Protéines (mg/mL)	0,5	0,4	0,6	0,5	1,3	0,7	0,9
	Activité (U/mL)	0,28	0,19	0,23	0,27	0,36	0,41	0,61
	AS (U/mg)	0,36	0,48	0,39	0,54	0,28	0,58	0,67
Éthanol	Protéines (mg/mL)	1,1	2,2	1,4	2,3	2,3	2,9	3,7
	Activité (U/mL)	0,26	0,36	0,39	0,3	0,3	0,2	0,15
	AS (U/mg)	0,23	0,16	0,28	0,13	0,13	0,07	0,04
Acétone	Protéines (mg/mL)	0,9	1,2	1,2	1,4	2,2	2,4	2,1
	Activité (U/mL)	0,30	0,42	0,48	0,59	0,36	0,28	0,17
	AS (U/mg)	0,33	0,35	0,40	0,41	0,16	0,11	0,09

Dans le cas de l'arabinose isomérase, le procédé de précipitation le plus intéressant vis-à-vis de l'activité récupérée et de l'activité spécifique est le sulfate d'ammonium à 80%. En ce qui concerne la précipitation à l'éthanol comme pour la xylose isomérase l'activité est inhibée au fur et à mesure de l'augmentation du pourcentage et permet également une moins bonne précipitation. De même pour la précipitation à l'acétone, on retrouve le plus d'activité avec 50%, mais avec une activité spécifique plus faible que pour le sulfate d'ammonium à 80%.

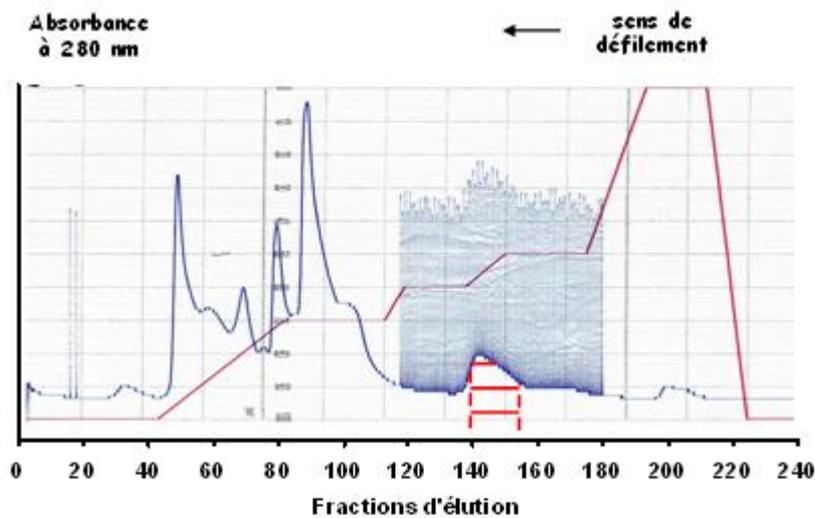
- **La chromatographie liquide échangeuse d'ions**

Le surnageant de précipitation est filtré et dialysé avant d'être déposé en plusieurs fois sur une colonne échangeuse d'ions avec un gel Q-sepharose. Les protéines ont été éluées grâce à

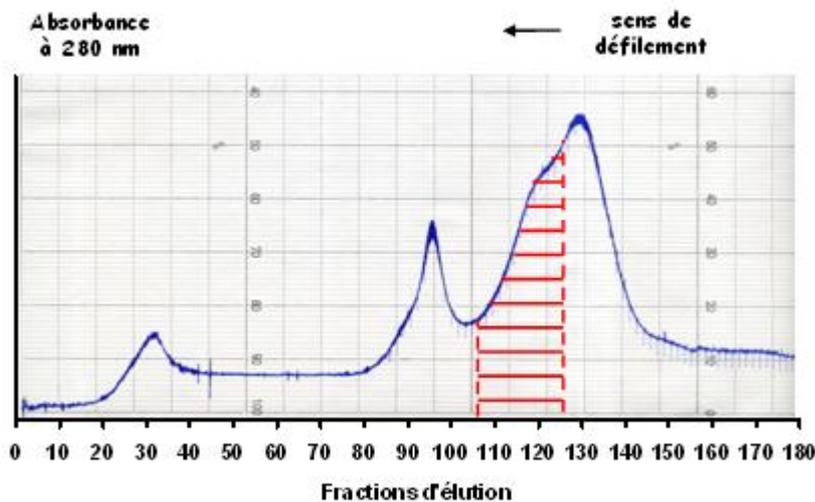
un gradient de sel préparé dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,5 contenant un molaire de NaCl [Figure 3]. D'après ces résultats, on observe que l'on retrouve le pic d'activité dans les tubes 125 à 136 sur le profil, c'est à dire pour un volume d'éluion de 2090 à 2255 mL ce qui correspond à un pourcentage de NaCl de 45 à 50%.

▪ La chromatographie par tamisage moléculaire

Les fractions contenant l'arabinose isomérase sont regroupées, concentrées et ultrafiltrées sur 10 kda avec un tampon phosphate 100 mM pH 7,0. La fraction enzymatique recueillie est déposée sur colonne Sephacryl S-200 en plusieurs fois et les protéines éluées sont récoltées en fraction de 1,5 mL [Figure 3].



Colonne Q-sepharose HP (56/30)
 Tampon d'éluion : 50 mM Tris-HCl pH 7,5
 Tampon du gradient : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 + 1 M NaCl
 Débit : 30 mL/min
 Dépôt protéique : 500 mg
 Fractions collectées : 14 mL



Colonne Sephacryl S-200 HR (16/60)
 Tampon d'éluion : 50 mM phosphate pH 6,5 + 150 mM NaCl
 Débit : 1,5 mL/min
 Dépôt protéique : 9 mg
 Fractions collectées : 2 mL

Figure 3 : Purification de l'activité arabinose isomérase de *L. bifementans* par chromatographie échangeuse d'ions et par chromatographie d'exclusion. Détection activité (■).

D'après ces résultats, l'activité est détectée dans les tubes 106 à 125 sur le profil, avec le maximum d'activité pour un volume d'éluion de 121mL et donc une masse moléculaire à partir de la calibration faite sur la colonne [Annexe 3], l'enzyme native a une masse d'environ 228 kDa \pm 8 kDa ce qui est semblable à celle trouvée par Yamanaka [1975] pour la souche *Lactobacillus gayonii*. En ce qui concerne les autres AI purifiées lors d'études précédentes, les masses molaires sont très variables allant de 230 kDa pour *Thermotoga maritima* [Lee et al., 2004] à 362 kDa pour *E. coli* [Patrick et Lee, 1975 ; Banerjee et al., 1995].

B.2.4. Résumé des purifications

Le Tableau 4 relate les rendements et les facteurs de purification obtenus pour les activités arabinose isomérase et xylose isomérase.

Tableau 4 : Schéma de purification des activités AI et XI.

Étape de purification	Volume (mL)		Protéine (mg/mL)		Activité (U)		Activité spécifique (U/mg)		Taux de purification		Rendement (%)	
	AI	XI	AI	XI	AI	XI	AI	XI	AI	XI	AI	XI
Cellules non cassées	800	800	6,3	5,6	1783	2796	0,35	0,62	1,0	1,0	100	100
Contenu intracellulaire	500	700	4,7	4,0	1591	2482	0,68	0,89	1,9	1,4	89,2	88,8
Précipitation	150	400	2,6	2,0	782	1200	2,04	1,47	5,8	2,4	43,9	42,9
Q-Sepharose	100	300	0,4	0,5	665	945	16,91	6,07	48,3	9,8	37,3	33,8
Sephacryl S200	50	100	0,1	0,2	394	366	70,26	21,64	200,7	34,9	22,1	13,1

B.3. Caractérisation des enzymes

B.3.1. Estimation de la masse moléculaire de l'enzyme

Les échantillons présentant les activités arabinose isomérase et xylose isomérase sont déposées sur gel de PAA en condition dénaturantes et contenant également les marqueurs de masses molaires. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie. Dans ces conditions, la masse de l'enzyme a été estimée à environ 55 kDa \pm 1 kDa.

Ce qui permet d'avancer que ces deux enzymes sont constituées de 4 monomères de taille identique, car l'on retrouve ainsi la valeur de la masse moléculaire de l'enzyme native obtenue sur tamisage moléculaire. Ce résultat est semblable à ceux déjà trouvés dans des travaux antérieurs sur les xylose isomérases qui sont majoritairement des homotétramères [Hess *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1996 ; Sailaja et richard, 1993 ; Kwon *et al.*, 1987]. Pour l'arabinose isomérase on observe également des différences comme pour la masse molaire avec un hexamère pour *E.coli* [Patrick et Lee, 1975 ; Banerjee *et al.*, 1995] et un homotétramère pour *Thermotoga maritima* [Lee *et al.*, 2004] comme dans notre cas.

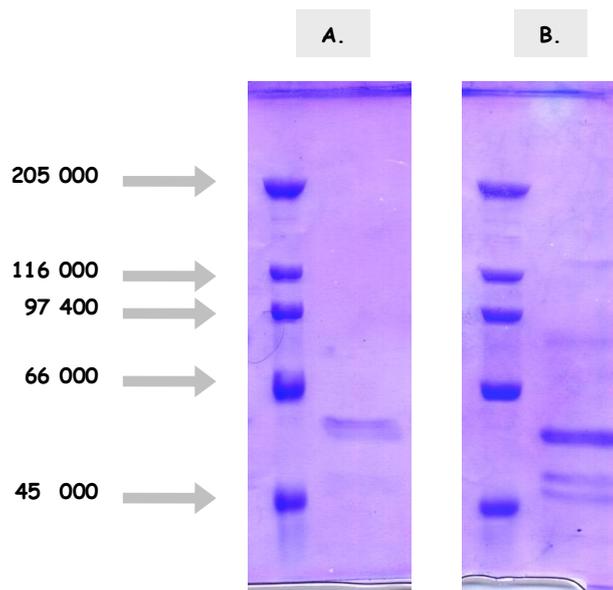


Figure 4 : Analyse électrophorétique des enzymes A - AI et B - XI de *L. bifementans*, après l'étape de chromatographie par tamisage moléculaire.

B.3.2. Séquençage par MALDI-MS de l'arabinose isomérase et de la xylose isomérase de *Lactobacillus bifementans*

En comparant les profils électrophorétiques [Figure 4](#) ainsi que la masse molaire obtenue par tamisage moléculaire de ces deux enzymes, on constate que leurs caractéristiques sont très similaires en prenant en compte le pourcentage d'erreur de chaque expérience. Nous avons donc décidé de réaliser un séquençage par MALDI-MS afin de déterminer si nous avons effectivement une seule enzyme qui réalise l'isomérisation des pentoses ou bien deux enzymes isomérisant chacune un seul pentose. Ce séquençage a été effectué par M. Chambon de l'unité INRA de Theix. Les résultats obtenus nous confirment l'hypothèse avancée ci-dessus et que l'on a une seule et même enzyme qui isomériser l'arabinose et le xylose et qui présente des similitudes avec l'arabinose isomérase de *L. pentosus* [[Annexe 4](#)].

B.3.3. Etude des paramètres physico-chimiques et cinétiques de l'enzyme partiellement purifiée

- Influence du pH et de la température sur l'activité

Afin d'étudier l'impact du pH, l'activité a été étudiée sur une gamme de pH comprise entre pH 4,0 et pH 9,0, par conséquent le choix des tampons a été essentiel. Le tampon Citrate-phosphate, Phosphate et Tris-HCl, que nous avons choisis pour ces expériences, couvrent une large gamme de pH, et n'influencent pas l'action de l'enzyme. La réaction est réalisée à 50 °C pendant 20 min.

L'évolution de l'activité en fonction de la température a été effectuée avec le tampon Tris-HCl, tamponnée au pH optimum déterminé précédemment. Le substrat, ainsi que l'échantillon enzymatique, sont incubés séparément 5 min à la température voulue allant de 30 à 90 °C, avant d'être mélangés. La réaction est stoppée après 20 min d'incubation.

Les résultats obtenus sont présentés dans la [Figure 5](#), et indiquent que, dans ces conditions expérimentales, l'activité est optimale à 60 °C, et cela, quels que soient les substrats utilisés. Alors que l'on trouve une légère différence pour le pH avec 7,0 sur le xylose et 7,5 sur l'arabinose.

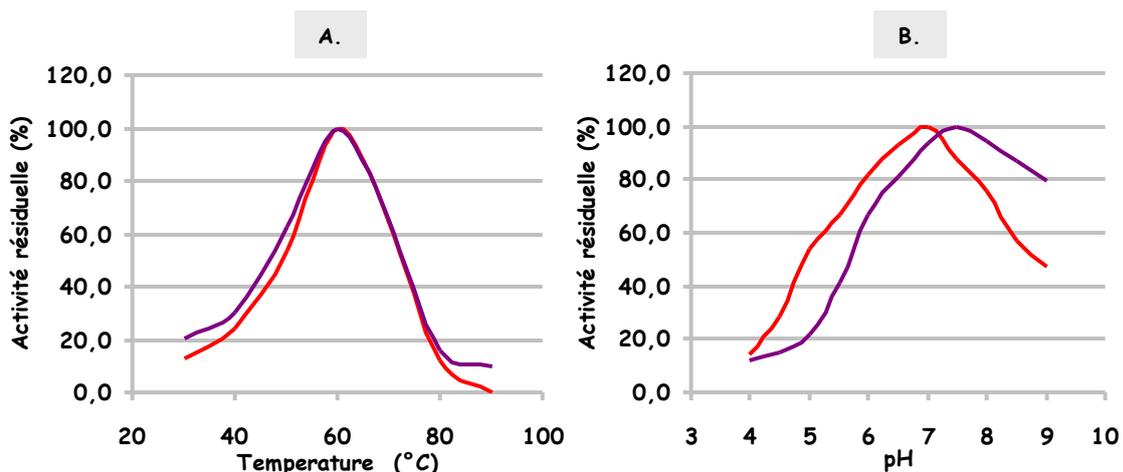


Figure 5 : Influence A - de la température et B - du pH sur l'activité AI (—) et XI (—) purifiées de *L. bifementans*.

L'optimum de température et du pH, aux environs de 60 °C et 7,0, sont supérieurs à ceux retrouvés pour l'activité arabinose isomérase de *Lactobacillus gayonii* qui n'est que de 40 °C et pH 6,0 [Yamanaka, 1975 ; Nakamatu et Yamanaka, 1969]. Cependant, ces caractéristiques sont similaires à ceux observés pour la xylose isomérase de *Lactobacillus brevis* [Bhosale et al., 1996]. L'enzyme est également dénaturée de façon irréversible après congélation, puisque, dans nos conditions expérimentales, l'activité n'est plus détectable, après 1 semaine à -20 °C et est stable pendant plusieurs mois à 4 °C.

▪ Étude de la stabilité vis-à-vis du pH

La stabilité des activités AI et XI a été testée dans une gamme allant de pH 4,0 à 8,0 pour une température de 60 °C et a été suivie au cours du temps en dosant l'activité résiduelle.

Ainsi pour des valeurs de pH allant de 6,0 à 8,0, l'activité AI a une demi-vie de 10 h et elle est de 7 h pour l'activité XI. Les activités AI et XI sont par contre très fortement dégradées pour des pH acides avec respectivement une perte d'activité de 65 et 95% au bout de 5 h à pH 4,0 et de 80% et 95% 10 h à pH 5,0.

L'étude de la stabilité a été également menée à des températures de 4°C (température de conservation) et de 25 °C (température de purification), dans ces conditions l'enzyme est stable durant plusieurs mois à 4 °C avec seulement une perte d'activité de 10% au bout de 4 mois, et de 20% au bout de 4 semaines à 25 °C.

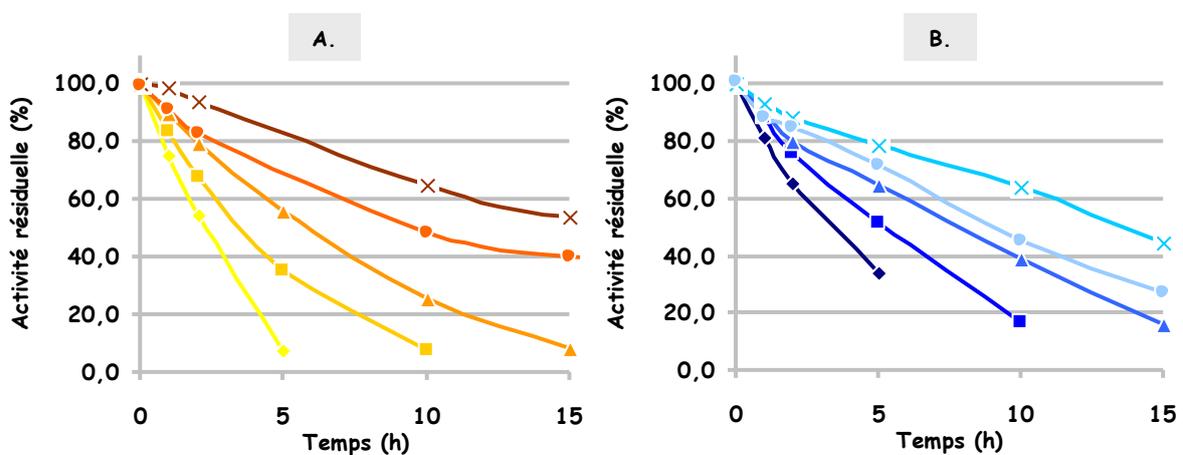


Figure 6 : Stabilité de l'enzyme AI de *L. bifermantans* en fonction du pH à 60 °C. **A** - substrat D-xylose (0,1 M). **B** - Substrat L-arabinose (0,1 M). (◆) 4,0 - (■) 5,0 - (▲) 6,0 - (×) 7,0 - (●) 8,0.

▪ Étude de la thermostabilité de l'enzyme

Cette étude consiste à pré-incuber l'enzyme avec ou sans glucide, à une température donnée, sur une durée précise et ensuite de doser l'activité résiduelle. Dans nos conditions expérimentales, l'incubation de l'enzyme avec l'arabinose ou le xylose permet d'augmenter plus ou moins la stabilité à la température, notamment pour l'arabinose.

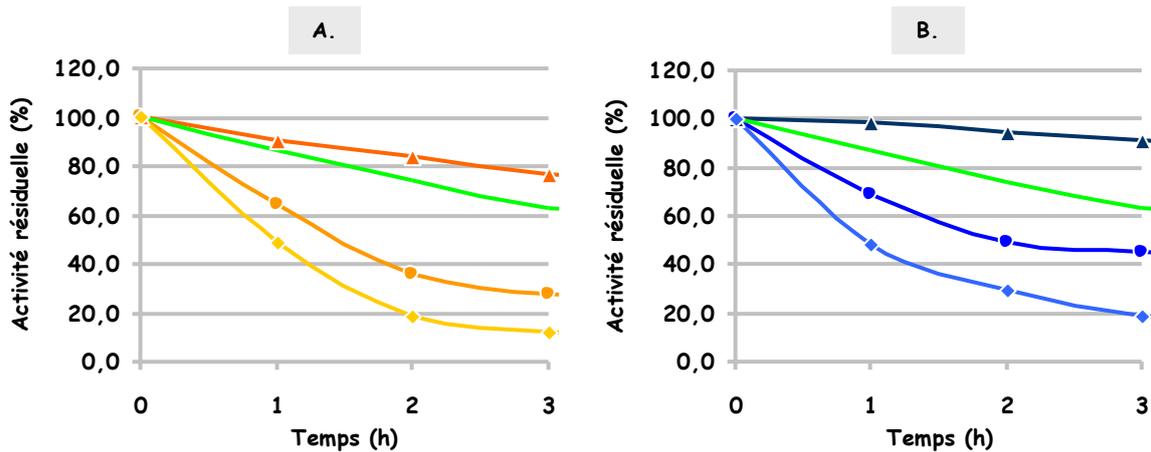


Figure 7 : Thermostabilité de l'activité arabinose isomérase de *L. bifermantans*. **A** - substrat D-xylose (0,1 M). **B** - Substrat L-arabinose (0,1 M). (▲) 50 °C - (●) 60 °C - (◆) 70 °C - (—) Témoin.

Ainsi, la demi-vie de l'enzyme est de 60 min à 70 °C quelque soit le pentose et 120 min à 65 °C en présence d'arabinose pour seulement 65 min avec le xylose. A la température optimale de 60 °C au bout de 3 h, on trouve encore 92% et 77% d'activité résiduelle respectivement en présence d'arabinose et xylose. Alors que si les pré-incubations sont effectuées sans substrat la thermostabilité diminue et l'activité restante au bout de 3 h à 60 °C est 60%.

▪ Activité en présence d'effecteurs

L'influence de divers composés chimiques, tels que les réducteurs de ponts disulfures (DTT, β -mercaptoéthanol), les chélateurs (EDTA, EGTA), les détergents (Triton X-100, SDS), les agents chaotropiques (urée, guanidine) et additifs divers (NaCl, éthanol, acétone, xylitol ou arabitol), ont été testés sur l'activité arabinose isomérase et xylose isomérase.

Tableau 5 : Effet de divers composés chimiques sur l'activité AI et XI de *L. bifementans*.

Agents	Concentration	Activité résiduelle (%)	
		AI	XI
Tampon pH 7,0	100 mM	100	
EDTA	20 mM	59,5	65,7
	50 mM	43,5	43,1
	80 mM	22,5	26,3
EGTA	20 mM	46,7	53
	50 mM	34,7	39,3
	80 mM	19,6	17,5
Guanidine	1 M	45	51,4
Urée	1 M	43,7	51,1
Triton X-100	1 %	101,8	103,8
SDS	1 %	261,8	241,6
	2,5 %	150,9	113,2
	5 %	109,2	107,4
DTT	50 mM	11,4	1,6
	100 mM	7,9	0,9
Éthanol	20 %	86,3	95,1
Acétone	20 %	53,4	69,4
β-mercaptoéthanol	1 %	75,1	73,7
	5 %	65	70,4
NaCl	500 mM	101,1	101
	1 M	86,2	95
Arabitol ou xylitol	5 mM	117,3	115,1
	10 mM	108,6	110,1
	20 mM	89,9	99,9

Les résultats présentés dans le [Tableau 5](#) montrent que les agents chaotropiques, les réducteurs de ponts disulfures et les chélateurs ont une action inhibitrice sur les activités, ce qui correspond aux résultats trouvés par [Lama et al. \[2001\]](#). Cependant pour les agents chélatants pour une même concentration on s'aperçoit que l'EGTA a une action plus inhibitrice que l'EDTA. En ce qui concerne les détergents on n'observe aucune inhibition de l'activité, mais au contraire une

augmentation de l'activité dans le cas du SDS. Cependant, le SDS provoque des interférences sur le dosage et ce résultat demanderait une vérification par un autre moyen de dosage. Alors que dans le cas de divers additifs, on observe une perte d'activité qu'à partir d'une concentration élevée de l'agent et l'acétone apparaît comme le plus inhibiteur.

Afin d'étudier la dépendance vis-à-vis de certains ions, les activités AI et XI ont été incubées pendant 30 min avec 10 mM d'EDTA, à 50 °C afin d'éliminer les cations déjà présents dans la solution. Après plusieurs lavages par ultrafiltration sur membrane de 10 kDa contre un tampon Tris-HCl 50 mM ajusté à pH 7,5, l'activité fut à nouveau recherchée afin de constater la disparition totale de l'activité et ainsi montrer l'absence d'un ion indispensable.

Plusieurs ions furent alors testés afin de déterminer si l'un d'entre eux avait la capacité de restaurer l'activité de la protéine. Comme le montre le [Tableau 6](#), certains ions ont permis d'augmenter significativement l'activité initiale, c'est notamment le cas des ions cobalt et manganèse pour les deux activités et du cuivre dans le cas de l'arabinose isomérase. Certains ions apparaissent comme des inhibiteurs de l'activité en ce qui concerne les ions ferreux, le strontium et le zinc alors que l'aluminium, le magnésium, le calcium et le nickel seraient sans effet.

Tableau 6 : Effet de divers ions sur l'activité AI et XI de *L. bif fermentans*.

Ions	Concentration	Activité résiduelle (%)	
		AI	XI
Tampon pH 7,0	100 mM	100	
AlCl₂	10 mM	98,6	105,3
CaCl₂	10 mM	94,2	92,0
CoCl₂	10 mM	164	134,9
CuCl₂	10 mM	134,8	97,5
FeCl₂	10 mM	64,1	71,2
MgCl₂	10 mM	102,1	98,5
MnCl₂	10 mM	150,9	137,6
NiCl₂	10 mM	100,9	91,4
StCl₂	10 mM	81,8	72,5
ZnCl₂	10 mM	50,3	77,4

La dépendance vis-à-vis des ions cobalt et manganèse est assez récurrente chez les isomérases d'une manière générale [[Jorgensen et al., 2004](#) ; [Lee et al., 2004](#) ; [Vieille et al., 1995](#)], cependant

pour l'activité XI l'ion magnésium est normalement le principal activateur [Bhosale *et al.*, 1996 ; Moneke et Bisswanger, 1998], ce que l'on ne retrouve pas pour notre enzyme .

▪ Étude des paramètres cinétiques de l'enzyme

Le séquençage des activités xylose isomérase et arabinose isomérase montrant que ce n'était qu'une seule et même enzyme qui isomérisent les deux pentoses, xylose et arabinose, nous obligea donc à utiliser ces deux molécules lors de nos études cinétiques. Nous avons également choisi d'étudier le galactose vu que nous sommes en présence d'une arabinose isomérase et que cette dernière présente un intérêt au niveau industriel dans l'isomérisation du galactose en tagatose [Kim *et al.*, 2002]. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 8, selon la représentation de Lineweaver et Burk.

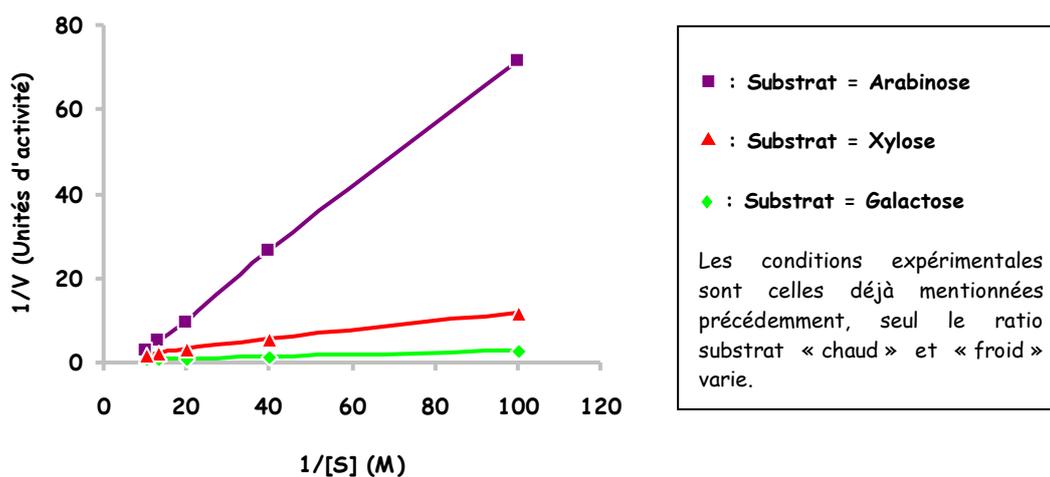


Figure 8 : Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme arabinose isomérase purifiée de *L. bifermantans* (représentation de Lineweaver et Burk).

Dans nos conditions expérimentales, le K_M apparent de l'enzyme pour l'arabinose est de $0,18 \text{ M} \pm 0,01 \text{ M}$. Cette valeur est très proche de celle déterminée pour le xylose et le galactose, qui est de $0,2 \text{ M} \pm 0,06 \text{ M}$. Cependant, dans le cas de *L. bifermantans* les trois substrats ne sont pas utilisés avec la même rapidité, puisque la vitesse de catalyse apparente varie d'un facteur 2 pour le xylose et 6 pour le galactose au profit de l'arabinose, qui apparaît alors comme le substrat physiologique de l'enzyme.

B.4. Conclusion

Nous avons pu montrer dans cette partie la présence des deux activités isomérases L-arabinose isomérase et D-xylose isomérase chez la souche *L. bifermantans*. Ces deux activités catalysent respectivement l'isomérisation réversible du L-arabinose en L-ribulose et du D-xylose en D-xylulose, cétooses qui sont alors retrouvés dans la voie des pentoses phosphate ou la voie du phosphoketolase [Belfaouh et Penninckx, 2000 ; Lee *et al.*, 2005]. Après purification de ces deux enzymes, nous avons constaté qu'elles possédaient des caractéristiques très similaires au niveau physico-chimiques, ce qui est retrouvé quand on observe les caractéristiques de ces deux enzymes chez d'autres souches [Kim *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2004 ; Yamanaka, 1975 ; Lama *et al.*, 2001 ; Kawai *et al.*, 1994]. Cependant, suite au séquençage de ces deux bandes, nous avons pu déterminer qu'il s'agissait de la même protéine, une L-arabinose isomérase, qui est capable d'isomériser l'arabinose et le xylose, ce qui n'a été montré que chez *E. coli* mais avec une très faible activité pour le xylose [Patrick et Lee, 1968]. Dans notre cas l'activité de l'enzyme sur le xylose présente une vitesse de catalyse supérieure à celle du galactose qui est normalement un substrat préférentiel des L-arabinose isomérases.

C. Optimisation des activités isomérases

C.1. Effet de la température sur la production des enzymes

Différentes températures d'incubation, 32, 35, 37, 40 °C ont été employées pour accroître la production des activités AI et XI à partir de *L. bif fermentans*. La fermentation est effectuée jusqu'à l'entrée dans la phase stationnaire de la souche. Les résultats sont présentés sur la Figure 9. La biomasse maximale et la production enzymatique (AI : 3,5 U/mL - XI : 2,6 U/mL) sont atteintes à 37 °C. On observe une diminution du rendement d'AI ou de XI quand la température d'incubation est plus élevée ou inférieure à la température optimale d'incubation. La température plus élevée s'est avérée avoir des effets nuisibles sur les activités enzymatiques du microorganisme et on constate également que les activités enzymatiques deviennent plus faibles pour une température plus basse.

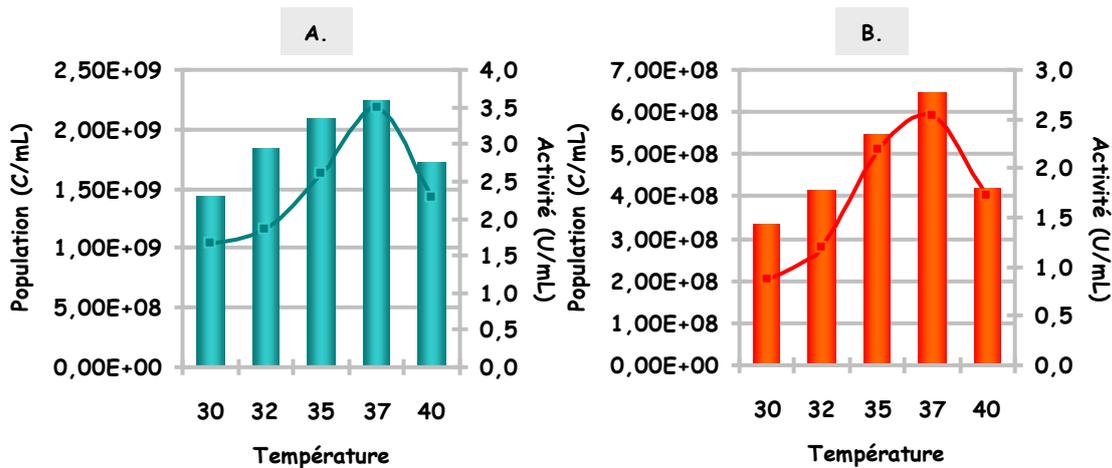


Figure 9 : Effet de la température sur la croissance bactérienne de *L. bif fermentans* (■) et sur sa production : **A** - AI et **B** - XI (—). La bactérie est cultivée à pH 6,8 sur milieu MRS, supplémenté par 10 g/L : **A** - arabinose ou **B** - xylose. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

En conséquence, la température d'incubation est cruciale, car elle a comme conséquence un temps de génération plus long du microorganisme et une phase plus importante de latence, diminuant de ce fait la quantité d'enzymes produites.

C.2. Effet du pH sur la formation d'enzymes

La production d'enzymes et la croissance de *L. bif fermentans* sont nettement influencées par le pH initial du milieu de culture. *L. bif fermentans* peut se développer et produire l'enzyme sur une gamme plutôt large de pH, comprise entre 5,0-9,0, toutefois le développement est plus important et constant entre 7,0 et 8,0 [Figure 10]. Dans une gamme inférieure à 7,0 ou supérieure à 8,0, la croissance diminue et le temps de latence est plus long. Cependant, la production maximale des enzymes a été obtenue quand le pH initial du milieu est ajusté à 7,5.

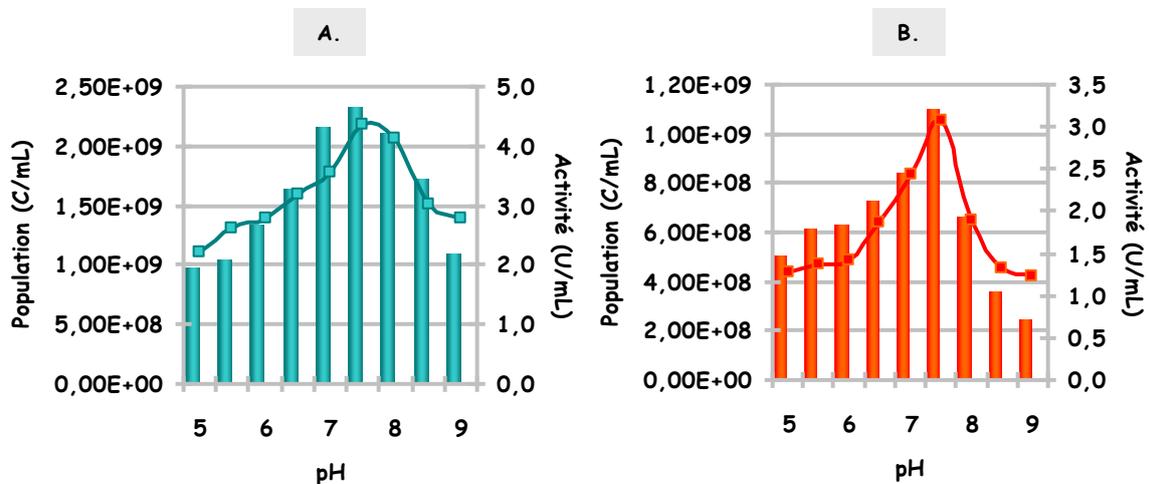


Figure 10 : Effet du pH sur la croissance bactérienne de *L. bif fermentans* (■) et sur sa production : A - AI et B - XI (—). La bactérie est cultivée à pH 6,8 sur milieu MRS, supplémenté par 10 g/L A - arabinose ou B - xylose. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

C.3. Effet d'âge et de taille d'inoculum

Une population cellulaire de 1.10^6 à 1.10^8 C/mL a été employé pour inoculer le milieu de culture afin d'établir l'effet de la taille d'inoculum sur la production d'enzymes pour *L. bif fermentans*. Un inoculum de 1.10^7 C/mL est optimal pour la croissance aussi bien que pour la production de l'AI et XI et la phase de latence étaient également minimales. Pour une population cellulaire plus élevée, on n'a observé aucune augmentation notable de l'activité. Avec une population de 1.10^6 C/mL, la phase de latence est augmentée sensiblement et l'activité maximale est obtenue pour un temps plus long d'incubation. De plus, une culture âgée de plus de 48 h utilisée comme inoculum, provoque une augmentation de la phase de latence, mais sans diminuer l'activité finale pour l'AI et XI.

C.4. Effet de source d'azote

L. bifementans ne peut pas se développer sans présence d'une source d'azote organique tel que l'extrait de levure, l'extrait de viande ou la peptone [Deshmukh *et al.*, 1994]. Les bactéries lactiques sont traditionnellement des microorganismes fastidieux et ont des conditions nutritives complexes dues à leur capacité limitée pour la biosynthèse des vitamines et des acides aminés [Chauhan *et al.*, 2005].

Tableau 7 : Effet des différentes sources d'azote sur la croissance bactérienne de *L. bifementans* et la production des enzymes AI et XI.

Source azote (*)	Source carbonée			
	Xylose		Arabinose	
	XI (U/mL)	Pop. (C/mL)	AI (U/mL)	Pop. (C/mL)
Controle (milieu MRS)	3,47	8,20E+08	5,07	1,12E+09
Organique :				
Peptone (2,5 g/L)	2,72	6,72E+08	3,87	1,01E+09
Peptone (17,5 g/L)	3,65	9,09E+08	5,10	1,28E+09
Tryptone (2,5 g/L)	2,69	6,13E+08	3,78	1,00E+09
Tryptone (17,5 g/L)	3,35	8,91E+08	4,99	1,13E+09
Extrait de viande (2,5 g/L)	3,43	4,46E+08	4,96	9,25E+08
Extrait de viande (17,5 g/L)	3,54	9,59E+08	5,23	1,40E+09
Extrait de levure (1 g/L)	3,92	7,28E+08	5,45	1,04E+09
Extrait de levure (9 g/L)	4,05	9,01E+08	6,42	1,19E+09
Inorganique :				
Citrate d'ammonium (0,5 g/L)	3,76	8,26E+08	5,43	1,19E+09
Citrate d'ammonium (3,5 g/L)	3,81	7,98E+08	5,04	1,22E+09
Phosphate d'ammonium (0,5 g/L)	3,71	8,33E+08	5,30	1,14E+09
Phosphate d'ammonium (3,5 g/L)	3,79	8,04E+08	5,11	1,16E+09
Sulfate d'ammonium (0,5 g/L)	3,13	8,116E+08	5,01	1,05E+09
Sulfate d'ammonium (3,5 g/L)	3,55	7,74E+08	4,78	1,08E+09

(*) La bactérie est cultivée à 37 °C et pH 7,5 sur milieu MRS. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

L'extrait de levure est le composant qui a le plus d'effet sur l'activité, en augmentant sa concentration on obtient une production enzymatique plus importante. Pour la peptone et l'extrait

de viande, leur augmentation ne donne pas une activité plus importante, mais dans le cas de la peptone la diminution provoque une perte d'activité alors que pour l'extrait de viande malgré une diminution de la population on observe une activité similaire au milieu témoin. La présence des sources inorganiques d'azote comme le citrate d'ammonium ou du phosphate d'ammonium dans le milieu de culture n'a pas un effet significatif sur la production des enzymes [Tableau 7]. Cependant dans le cas du sulfate d'ammonium l'activité AI est légèrement plus faible. D'ailleurs, l'absence d'azote inorganique a un rôle sur la croissance du micro-organisme en la diminuant.

C.5. Effet des ions divalents

Beaucoup de micro-organismes produisant la XI exigent les ions bivalents comme cofacteurs tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} et Co^{2+} [Deshmukh *et al.*, 1994 ; Bhosale *et al.*, 1996] et l'enzyme AI est également connue pour être un métalloprotéine [Lee *et al.*, 2005].

Tableau 8 : Effet de différents ions bivalents sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour *L.bifermentans*.

Ions (*)		Source de carbone			
		xylose		arabinose	
mM		AI (U/mL)	Pop. (C/mL)	AI (U/mL)	Pop. (C/mL)
Contrôle (sans ions)		3,87	1,17E+09	4,36	1,38E+09
Magnesium	1	4,29	1,62E+09	5,30	1,71E+09
	2,5	4,18	1,80E+09	5,29	2,04E+09
Cuivre	2,5	4,47	1,44E+09	4,01	1,28E+09
Fer	2,5	4,00	2,20E+09	4,07	2,21E+09
Zinc	2,5	4,24	1,41E+09	5,14	1,51E+09
Calcium	2,5	4,58	1,73E+09	5,25	1,80E+09
Cobalt	2,5	5,02	1,97E+09	5,35	1,50E+09
Manganèse	0,5	5,35	2,03E+09	5,94	2,46E+09
	1	5,75	2,54E+09	6,30	2,67E+09
	2,5	5,78	2,38E+09	6,57	2,51E+09
	5	5,46	2,30E+09	5,91	2,43E+09

(*) La bactérie est cultivée à 37 °C et pH 7,5 sur milieu MRS. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

La croissance de *L. bif fermentans* est stimulée considérablement en présence du manganèse. On peut observer l'effet du manganèse sur l'augmentation de l'activité même quand on l'a ajouté à la culture avec une molarité de 1 mM, par contre pour une concentration plus élevée on constate une diminution de la population [Tableau 8]. Cependant, le maximum de l'activité est trouvé pour une molarité de 2,5 mM.

D'autres ions tels que la Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} et Zn^{2+} permettent d'augmenter l'activité, mais plus faiblement que le manganèse. De plus, en présence des ions Co^{2+} , Ca^{2+} et Zn^{2+} la souche se développe plus faiblement qu'en présence du manganèse voir même par rapport au témoin c'est-à-dire en absence d'ions. Tandis que d'autres ions tels que Cu^{2+} et Fe^{2+} inhibent la production de ces isomérases.

C.6. Effet de source de carbone

Les hydrates de carbone sont des sources importantes de carbone et d'énergie pour les cultures cellulaires. Les effets de diverses sources de carbone sur la production de ont été rapportés, mais seul le D-xylose est une condition obligatoire pour induire la production de l'enzyme. Cependant, l'amidon, le glucose, le sorbitol, ou le glycérol pourraient être employés au lieu de 75% de xylose [Bhosale *et al.*, 1996 ; Deshmukh *et al.*, 1994].

Afin d'identifier une source appropriée de carbone pour la production de l'AI et XI par *L. bif fermentans*, différents hydrates de carbone, c.-à-d. le xylose, l'arabinose, le glucose et le galactose ont été étudiés dans le milieu contenant de la peptone (1%), de l'extrait de viande (2%) et de l'extrait de levure (1%) comme source d'azote. D'autres sources de carbone comprenant le fructose, le sorbitol, le xylane et l'amidon ont été également examinées dans des expériences préliminaires et aucune production AI/XI n'a été obtenu [données non montrées].

Tableau 9 : Effet de la source de carbone et de sa concentration sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour *L.bifermentans*.

Source carbonée (*)	AI (U/mL)	XI (U/mL)	Pop. (C/mL)
Arabinose			
0,50%	5,05	3,38	1,62E+09
1%	5,30	3,76	2,52E+09
2%	5,30	3,53	2,55E+09
Xylose			
0,50%	3,73	3,61	1,37E+09
1%	4,29	3,93	1,68E+09
2%	4,15	3,89	1,90E+09
Arabinose + Xylose			
0,5% + 0,5%	4,72	3,80	1,80E+09
1% + 1%	4,88	3,93	2,34E+09
Glucose + Arabinose			
0,2% + 0,5%	4,91	3,67	2,90E+09
0,2% + 1%	5,43	4,24	2,92E+09
Glucose + Xylose			
0,2% + 0,5%	4,73	3,93	2,49E+09
0,2% + 1%	4,88	4,79	2,47E+09
Galactose + Arabinose			
0,2% + 0,5%	4,98	4,24	2,47E+09
0,2% + 1%	5,57	4,47	2,53E+09
Galactose + Xylose			
0,2% + 0,5%	4,46	3,82	1,29E+09
0,2% + 1%	4,57	4,15	1,77E+09

(*) La bactérie est cultivée à 37 °C et pH 7,5 sur milieu MRS. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

Les résultats sont montrés dans le [Tableau 9](#). Il s'avère que l'arabinose est une meilleure source de carbone que le xylose pour l'AI, mais également pour la production de XI. D'ailleurs, la biomasse est la plus importante quand l'arabinose est employé comme source de carbone. Cependant, la biomasse atteint un niveau plus élevé en employant le glucose en tant que seule source de carbone dans le milieu et on retrouve également la production de l'activité AI et XI mais le rendement est inférieur par rapport aux pentoses. Le galactose n'est pas approprié à la croissance cellulaire et à la production des activités AI et XI, car aucune production n'a été détectée. Afin de déterminer la concentration optimale de pentose pour la production des enzymes, différentes concentrations (0,5-2%) des sources de carbone ont été employées dans le milieu. Avec l'augmentation des concentrations d'arabinose ou de xylose, l'activité AI/XI a augmenté parallèlement à l'augmentation de la concentration des pentoses jusqu'à 10 g/L dans le milieu et a ensuite diminué pour des concentrations plus importantes.

Au contraire, le fait d'ajouter le glucose ou le galactose à l'arabinose ou au xylose permet d'augmenter très légèrement la production d'AI/XI et l'activité maximale est trouvée pour un mélange de galactose (0,2%) et d'arabinose (1%). Toutefois, cette augmentation n'est pas vraiment significative comparée à l'utilisation seule des pentoses, nous avons ainsi choisi pour la suite de l'étude de continuer avec l'arabinose (1%) en tant que seule source de carbone.

C.7. Effet des autres composants du milieu MRS

Nous avons ensuite examiné l'effet des autres composants du milieu MRS tels que l'acétate de sodium, le phosphate dipotassique ou le Tween 80 [Tableau 10]. Le Tween 80 a été ajouté comme un agent tensio-actif pour étudier ses effets sur la perméabilité de la paroi bactérienne et il accélère également leur taux de croissance et la production en facilitant les phénomènes de transfert de masse à travers la paroi cellulaire [Lee *et al.*, 1997]. L'augmentation de la quantité en Tween 80 n'est pas significative sur l'augmentation de l'activité AI et XI au contraire la diminution présente un effet sur la multiplication cellulaire.

Tableau 10 : Effet des différents composants du milieu MRS sur la croissance bactérienne et sur la production en AI et XI pour *L.bifermentans*.

Source (*)	Source carbonée			
	Xylose		Arabinose	
	XI (U/mL)	Pop. (C/mL)	AI (U/mL)	Pop. (C/mL)
Controle (milieu MRS)	3,47	8,20E+08	5,07	1,12E+09
Phosphate dipotassique (0,5 g/L)	3,91	8,09E+08	5,23	1,02E+09
Phosphate dipotassique (3,5 g/L)	3,12	8,32E+08	5,06	1,27E+09
Acétate de sodium (1 g/L)	3,40	6,03E+08	3,93	8,38E+08
Acétate de sodium (9 g/L)	3,65	8,97E+08	5,33	1,45E+09
Citrate de sodium (1 g/L)	3,49	6,77E+08	4,95	8,91E+08
Citrate de sodium (9 g/L)	3,77	9,43E+08	5,27	1,51E+09

(*) La bactérie est cultivée à 37 °C et pH 7,5 sur milieu MRS. Les résultats ont été obtenus à partir de plusieurs essais de cultures en tubes de 50 mL.

L'acétate ou le citrate de sodium ont augmenté la croissance des cellules, mais l'augmentation concernant la production de l'AI et XI est faible. Ces composants sont employés pour avoir un effet tampon sur le milieu. Pour la source de phosphate, l'augmentation n'a aucune incidence ou

une réduction très légère de l'activité. D'autre part, la diminution de la concentration en phosphate améliore sensiblement la production dans l'AI et XI. Cependant, on n'observe aucun effet sur la croissance cellulaire.

C.8. Profil de croissance et de production d'enzymes

Le profil de la croissance et de la production d'enzymes par *L. bif fermentans* a été réalisé en culture batch sous l'agitation sur milieu MRS non modifié (A) et optimisé (B) [Figure 11]. De plus, nous avons testé l'effet d'une culture sous bullage d'azote c'est-à-dire en anaérobie comparée à une culture en condition microaérophile. Dans les conditions d'anaérobie *L. bif fermentans* présente un temps de génération d'approximativement 115 min comparées à 91 min en microaérophilie et présente une phase de latence d'environ 1 h, pour une biomasse finale qui est plus faible. En conséquence, l'activité produite par la souche est faible (données non montrées).

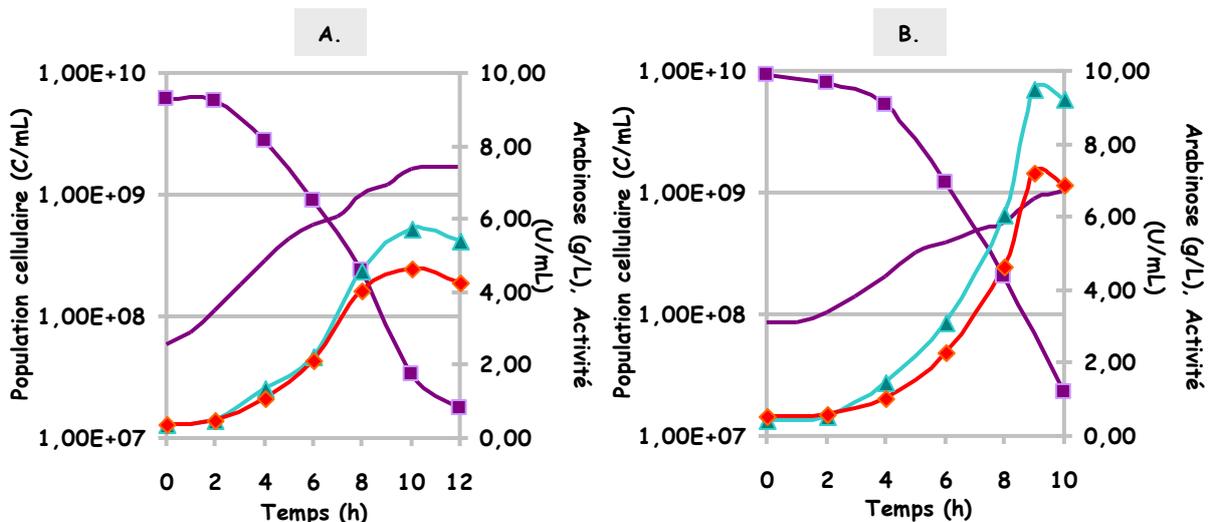


Figure 11 : Comparaison des cinétiques de production de AI et XI par *L. bif fermentans* sur **A** - MRS de base et **B** - milieu modifié en culture batch : activité AI (▲), activité XI (◆) arabinose (■), biomasse (—). La souche est cultivée à 37 °C et pH 7,5 avec Mn^{2+} 2,5 mM, arabinose 10 g/L, Tween 80 1 g/L.

La Figure 11 montre en fonction du temps les profils de la croissance cellulaire, de la consommation en glucides et de la production des activités AI/XI dans un milieu supplémenté avec de l'arabinose (1%). *L. bif fermentans* se développe rapidement et atteint la phase stationnaire après 8 h de culture pour le milieu optimisé alors qu'elle n'est atteinte qu'au bout de 10-11 h pour le milieu MRS de base. D'une part, la population cellulaire maximale obtenue est

similaire pour les deux milieux avec $2,5 \cdot 10^9$ C/mL et l'arabinose est épuisé à 90-95% en fin de culture. La production maximale des activités AI et XI est atteinte à l'entrée de la phase stationnaire avec respectivement 9,52 U/mL et 7,24 U/mL, la productivité est améliorée d'environ 65% par rapport au milieu témoin.

C.9. Conclusion

L. bif fermentans a été employé pour produire les activités intracellulaires L-arabinose isomérase et D-xylose isomérase. Divers facteurs de la fermentation, tels que la composition des substrats, la température de l'incubation, la période de la fermentation et les composants additionnels tels que les sels minéraux, la source de carbone et la source d'azote, ont été étudiés et optimisés. Un pH de 7,5 et une température de culture de 37 °C se sont avérés être optimaux pour la production de cette enzyme. Parmi les diverses sources de carbone et les sources organiques d'azotes utilisés, l'arabinose et le mélange peptone - extrait de viande sont les plus efficaces pour le rendement des enzymes. Une augmentation de concentration initiale en arabinose de 5 à 10 g/L dans le milieu de fermentation a permis d'augmenter la croissance cellulaire aussi bien que la production enzymatique. À un niveau plus élevé de sucre (20 g/L) la biomasse cellulaire et la production d'enzymes ont diminué. Au niveau de la source de carbone, un autre avantage malgré le coût de l'arabinose est qu'il permet d'induire les deux activités, cependant on peut partiellement le remplacer par du glucose sans diminuer l'activité enzymatique. D'autre part, la souche a besoin absolument du Tween 80 et de source non peptidique d'azote telle que le citrate d'ammonium pour pouvoir croître. Le taux de production d'enzymes a été augmenté quand les ions divalents ont été ajoutés au milieu et principalement le manganèse.

La composition du milieu optimisé avec la méthodologie de surface de réponse est : peptone (10 g/L), extrait de viande (2,5 g/L), extrait de levure (10 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), citrate d'ammonium (0,5 g/L) et acétate de sodium (5 g/L). L'activité AI/XI sont de 9,4 et 7,24 U/mL, respectivement. L'activité AI/XI est optimale au bout de 9h de culture en entrée de phase stationnaire en utilisant le milieu optimisé et est 1,6 fois plus élevée que sur le milieu original. La diminution de l'activité enzymatique lors de la phase stationnaire peut être expliquée par les effets néfastes du pH acide ou certains sous-produits tels que des protéases qui vont lyser les cellules et ainsi provoquer la libération du contenu intracellulaire [Bakhtiari *et al.*, 2006].

D. Immobilisation des activités isomérases sur alginate de sodium

D.1. Étude des différents paramètres d'inclusion des activités isomérases

Les conditions d'immobilisation de l'activité arabinose isomérase de *L. bif fermentans*, telles que le pourcentage d'alginate de sodium, la taille des billes et la quantité de biomasse à immobiliser, ont été testées. Les conditions optimales de ces trois caractéristiques obtenues pour l'activité arabinose isomérase sont similaires à celles trouvées pour la production d'acide lactique [Chapitre V, Résultats 1^{ère} partie] avec 2% d'alginate de sodium pour une taille de 2 mm et une biomasse cellulaire de 1 g/100 mL d'alginate.

En ce qui concerne l'immobilisation d'activités enzymatiques, on trouve deux possibilités, soit l'inclusion de cellules entières [Bucke, 1981 ; Horwath, 1986] soit d'enzymes partiellement purifiées [Visuri, 1999 ; Gaikwad et Deshpande, 1992]. Par conséquent, nous avons testé l'immobilisation de notre activité enzymatique après les différentes étapes de purification réalisées sur celles-ci. De plus l'immobilisation a été réalisée dans les mêmes conditions que pour les cellules entières. Les résultats obtenus après inclusion de l'enzyme partiellement purifiée nous permettent d'avancer que le cassage cellulaire par rapport à l'immobilisation des cellules entières ne permet pas d'améliorer l'activité, par conséquent il n'est donc pas nécessaire de réaliser une étape supplémentaire avant immobilisation qui ne ferait qu'augmenter les coûts alors que seules les préparations enzymatiques présentant un bon rendement et produite de façon économique conviennent pour une utilisation commerciale [Bhosale *et al.*, 1996].

D.1.1. Essai d'inclusion avec différentes molarités pour l'ion cobalt

Sachant que les activités AI et XI de *L. bif fermentans* sont activées en présence des ions cobalt et manganèse [Chapitre B.3.3, Résultats 3^{ème} partie], nous avons décidé d'utiliser l'ion cobalt pour réaliser l'inclusion sur alginate en remplacement de l'ion calcium utilisé habituellement. L'ion manganèse n'a pas été retenu car il ne permet pas une bonne formation des billes [Chapitre E.1.1, Résultats 1^{ère} partie]. Différentes molarités en cobalt, allant de 25 à 500 mM, ont été testées afin d'observer la molarité pour laquelle on obtient le meilleur taux d'isomérisation tout en réalisant une bonne inclusion. La Figure 12 montre que l'activité est

optimale pour une molarité de 50 mM de cobalt, alors que pour des concentrations supérieures en cobalt on observe une diminution de l'activité.

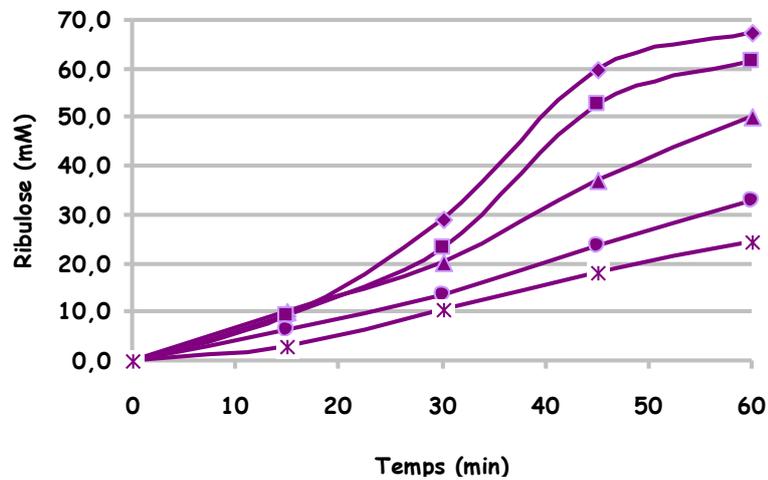


Figure 12 : Effet de la molarité de l'ion cobalt sur la formation du ribulose à partir de AI de *L. bifementans* immobilisée sur alginate de sodium. (▲) 25 mM - (◆) 50 mM - (■) 100 mM - (●) 250 mM - (×) 500 mM.

D.1.2. Effet du tampon de suspension de la biomasse cellulaire

Afin de pouvoir réaliser l'isomérisation dans des conditions optimales, un test sur l'influence de la resuspension de la biomasse à partir de différents tampons a été réalisé.

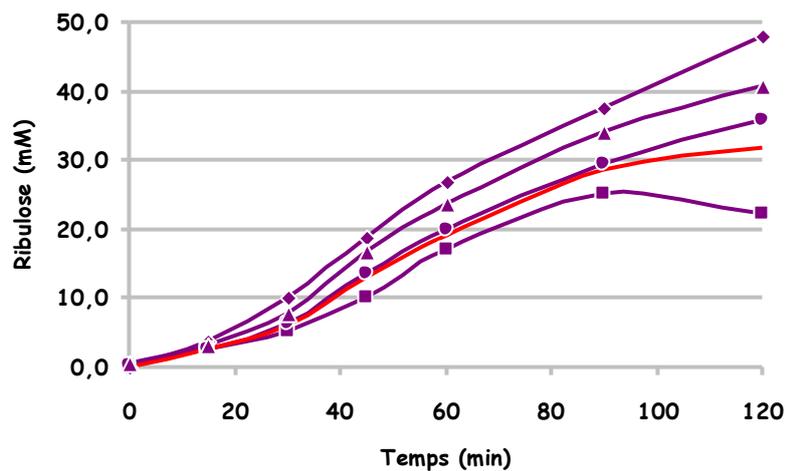


Figure 13 : Effet du tampon de suspension de la biomasse cellulaire sur l'activité de AI de *L. bifementans*. (◆) Tris-HCl - (■) Phosphate - (●) MES - (▲) PIPES - (—) Eau.

Les tampons ont tous été utilisés dans les mêmes conditions avec une molarité de 50 mM et pour un pH de 7,5. D'après les résultats obtenus, les différents tampons vont avoir une influence sur l'isomérisation et plus précisément sur l'activité par rapport à la suspension de la biomasse cellulaire avec de l'eau. Le tampon Tris-HCl est le tampon qui permet d'obtenir le meilleur taux d'isomérisation avec ensuite le PIPES. Par contre le tampon MES ne permet que très faiblement d'augmenter l'activité alors que le tampon phosphate provoque une dissolution de l'alginate et donc au final la biomasse cellulaire se retrouve dans le milieu.

D.2. Caractérisation des propriétés de l'enzyme immobilisée

L'immobilisation permet d'améliorer la résistance de l'enzyme aux conditions qui lui sont normalement néfastes. Nous avons donc testé les effets de la température et du pH sur l'activité immobilisée dans les mêmes conditions que l'enzyme native. Sur la [Figure 14](#), nous observons qu'une fois immobilisée elle présente une activité sur une gamme de température et de pH plus importante. Dans le cas de la température, l'activité subit une perte d'activité inférieure à 20% entre 45 et 70 °C alors que pour le pH entre 5,5 et 9,5.

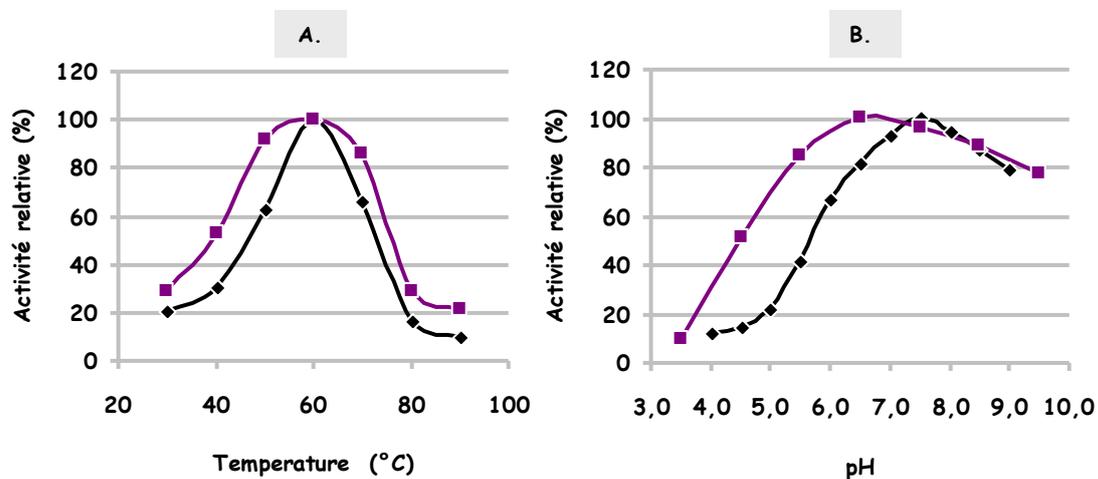


Figure 14 : Comparaison de l'effet de la température et du pH entre AI native (◆) et immobilisée (■) de *L. bifementans*. **A** - Température. **B** - pH.

D.3. Conclusion

Les essais réalisés pour l'immobilisation de l'enzyme L-arabinose isomérase sur alginate de sodium ont permis de déterminer différents paramètres de cette inclusion, notamment la

molarité de l'ion cobalt et le tampon utilisé pour le maintien de l'enzyme. Par conséquent, l'inclusion doit être réalisée avec une enzyme maintenue dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 et en coulant les billes d'alginate dans une solution de cobalt à 50 mM. Ceci nous a permis d'augmenter la stabilité de notre enzyme aux conditions de températures et de pH. Cependant ces résultats n'ont pu être obtenus qu'en présence de L-arabinose. Les résultats escomptés, au vu des cinétiques observées à partir de l'enzyme native sur D-xylose ou sur D-tagatose n'ont pas été retrouvés. En effet, en présence de D-xylose seule une très faible activité a pu être détectée et sur D-galactose aucune isomérisation n'a pu être observée.

Conclusions Générales et Perspectives

Le but de ce travail était dans un premier temps de réussir à mettre en place un procédé potentiellement viable et consistant en la production d'acide lactique à partir de sirop de son de blé. Ce dernier est un mélange d'oses simples (glucose, xylose et arabinose avec en majorité du xylose) provenant de l'hydrolyse de son de blé qui constitue un déchet pour l'industrie céréalière.

La première étape fut donc de sélectionner une souche capable de réaliser une fermentation à partir de tous les hydrates de carbone contenus dans le sirop de son. Pour cela nous avons criblé différentes bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* connues comme utilisatrice des pentoses. *Lactobacillus bifementans* a ainsi été sélectionné, car elle réussit à fermenter les trois principaux glucides du son avec une vitesse de consommation non négligeable et notamment supporte la forte pression osmotique provoquée par la concentration importante de glucides contenus dans sirop de son. Cette souche consomme préférentiellement le glucose comme chez la plupart des microorganismes, avec ensuite une très bonne consommation de l'arabinose et plus faiblement du xylose avec une consommation totale de ces sucres entre 20 et 25 h de culture, et cela, sur un milieu contenant environ 20 g/L de sucres réducteurs. Elle réalise pour cela une fermentation homolactique sur glucose et hétérolactique sur les pentoses avec dans notre cas production d'acide acétique en plus faible concentration que l'acide lactique. Par la suite, une amélioration de la consommation de ces glucides à 5 carbones a été obtenue grâce à l'apport simple de 2,5 mM de manganèse au lieu du mélange magnésium et manganèse.

Fort de ces résultats, nous avons donc testé cette bactérie sur le sirop de son à partir du milieu MRS de base. Nous avons pu ainsi constater par suivi C.L.H.P. que celle-ci consommait par ordre préférentiel le glucose, l'arabinose et le xylose pour finir. Par la suite nous avons donc cherché à optimiser les conditions de culture de cette souche telles que la température, le pH et les composants du milieu de culture en prenant comme base le milieu MRS complété par du sirop de son pour une concentration finale de 40 g/L. De même, nous avons effectué ces optimisations en parallèle sur deux procédés de fermentations différents en réacteur « batch » à partir de cellules libres et avec des cellules immobilisées par inclusion sur alginat de sodium.

Lors des travaux sur l'effet des différents composants du milieu MRS, il est apparu que la peptone de caséine, le sulfate d'ammonium, l'extrait de viande et l'extrait de levure étaient les facteurs affectant le plus cette production. L'effet de l'acétate ou du citrate de sodium ne joue un rôle positif sur la production que dans le cas de fermentations sans maintien du pH à cause de son pouvoir tampon. Les interactions entre ces facteurs nous ont alors permis de formuler un milieu optimisé, pour la culture sur cellules libres, composé de 10 g/L de peptone de caséine, 4 g/L d'extrait de viande, 10 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de phosphate d'ammonium, 1 g/L de Tween 80 et 2,5 mM de manganèse. La poursuite de l'optimisation a également permis de démontrer que la culture de *Lactobacillus bif fermentans* nécessitait une température de 35 °C et pH 7,0 afin d'obtenir la meilleure production d'acide sur pentoses, mais qu'un meilleur rendement pour les hexoses dans des conditions similaires a pu être obtenu à 37 °C et pH 7,5. Le maintien des conditions de pH et de température en fonction du substrat a donc été réalisé lors des fermentations pour obtenir une meilleure production d'acide lactique.

En ce qui concerne l'étude sur la fermentation à partir de *L. bif fermentans* immobilisée, nous avons utilisé l'alginate de sodium que nous avons coulé dans l'ion calcium 50 mM pour la formation des billes. Le plan d'expérience Plackett et Burmann réalisé sur le milieu MRS a révélé que la peptone, l'extrait de levure et l'acétate de sodium sont les composants qui ont le plus d'effet sur la production d'acide lactique. Par la méthode de réponse des surfaces nous avons ainsi mis au point un milieu de culture optimisé composé de 15 g/L de peptone de caséine, 4 g/L d'extrait de viande, 12 g/L d'extrait de levure, 1 g/L Tween80, 2 g/L de sulfate d'ammonium, 5 mM de manganèse et 5 mM de calcium. La différence par rapport au milieu de fermentation pour les cellules libres est que le phosphate d'ammonium ou le citrate de sodium ne sont pas utilisables en raison de leurs effets néfastes sur les billes.

Les perspectives envisagées pour cette étude sont diverses :

- ➔ Réaliser les mêmes fermentations à l'échelle d'un pilote en plus gros volume
- ➔ Déterminer précisément le ratio D-/L-acide lactique
- ➔ Utiliser des technologies de fermentations de types procédés continus multi-étagés qui sont plus productifs que les procédés classiques en « batch »
- ➔ Confirmer la stabilité des cellules immobilisées au bout de plusieurs utilisations

- ➔ Identifier précisément le mode fermentaire utilisé pour chaque hydrate de carbone
- ➔ Étudier le taux maximum de sucres pouvant être ajouté au milieu et la tolérance à l'acide lactique produit pour *Lactobacillus bifementans*
- ➔ Diminuer autant que possible la quantité de peptones et d'extrait de levures composant le milieu et qui augmentent le coût final de l'acide lactique

Dans la deuxième partie de ces travaux, notre objectif était de produire, purifier et caractériser les isomérases contenues dans la bactérie *Lactobacillus bifementans*. Le but est ensuite d'immobiliser ces deux enzymes ensemble de pouvoir isomériser les pentoses contenus dans le sirop de son de blé. Dans un premier temps, différentes techniques ont été mises au point afin de pouvoir caractériser précisément l'activité L-arabinose isomérase au cours des étapes de purification, mais également de pouvoir déterminer la quantité de chaque isomère produit lors d'une isomérisation réalisée sur un milieu complexe contenant plusieurs hydrates de carbone comme le sirop de son de blé.

Après avoir purifié ces deux enzymes, la L-arabinose isomérase et la D-xylose isomérase, la caractérisation et le séquençage par MALDI-MS ont révélés finalement qu'il s'agissait de la même enzyme qui possède ces deux activités : une L-arabinose isomérase qui présente des homologues peptidiques avec la même enzyme provenant de la bactérie lactique *Lactobacillus pentosus*. Cette isomérase a une spécificité de substrat très intéressante, car outre son substrat préférentiel qui est le L-arabinose, elle catalyse également l'isomérisation du D-xylose et ce plus rapidement que le D-galactose qui est lui aussi un substrat préférentiel de l'enzyme. Ceci peut également expliquer le fait que la souche utilise lors de la fermentation du sirop de son d'abord l'arabinose puis seulement après le xylose. L'enzyme possède une masse molaire d'environ 220 kDa et présente sur gel de PAA en condition dénaturantes une masse de 55 kDa, il s'agit par conséquent d'une protéine homotétramérique. Elle est stable à 90% et 80% à 60 °C pendant 3 h respectivement en présence d'arabinose et de xylose. Pour des valeurs de pH allant de 6,0 à 8,0, elle présente une demi-vie de 10 h en présence d'arabinose et de 7 h avec du xylose à 60 °C.

Cette arabinose isomérase a ensuite été immobilisée sur alginate de sodium en présence d'ion cobalt à 75 mM afin de tester l'isomérisation sur les deux substrats présentant un intérêt au

niveau industriel, le xylose et le galactose. Cependant à ce stade de l'étude, ce procédé n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés.

Différentes perspectives peuvent être envisagées pour l'immobilisation :

- ➔ Réaliser l'isomérisation en colonne thermostatée sur chaque hydrate de carbone et déterminer parallèlement le débit de passage du substrat ;
- ➔ Tester d'autres méthodes d'immobilisation ;
- ➔ Déterminer la stabilité de l'enzyme sur une longue période.

Références

A

- Aasen IM, Mbretrb T, Katla T, Axelsson L, Stbrrb I: **Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2000, **53**:159- 166.
- Abdel-Naby M, Mok K, Lee C: **Production of organic acid from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria.** *UNIDO Proceedings* 1992:227-243.
- Abe S, Takagi M: **Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid.** *Biotechnology and Bioengineering* 1991, **37**:93-96.
- Adachi E, Mikiko T, Sugiyama M, Nikawa JI, Shimuzu K: **Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value.** *J Fermentation and Bioengineering* 1998, **86**:284-289.
- Aeschlimann A, Von Stockar U: **The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1990, **32**:398-402.
- Ajioka M, Suizu H, Higuchi C, Kashima T: **Aliphatic polyesters and their copolymers synthesized through direct condensation polymerization.** *Polymer Degradation and Stability* 1998, **59**:137-143.
- Akerberg C, Zacchi G: **An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour.** *Bioresource Technology* 2000, **75**:119-126.
- Altaf M, Naveena BJ, Reddy G: **Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L(+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation.** *Food Technology and Biotechnology* 2005, **43**:235-239.
- Altaf M, Naveena BJ, Reddy G: **Use of inexpensive nitrogen sources and starch for l(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation.** *Bioresource Technology* 2006.
- Andersson LO, Borg H, Mikaelsson M: **Molecular weight estimations of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity.** *FEBS Letters* 1971, **20**:199-202.
- Andrews MA: **capillary gas-chromatographic analysis of monosaccharides: improvements and comparisons using trifluoroacetylation and trimethylsilylation of sugar obenzyl- and O-methyl-oximes.** *Carbohydrate Research* 1989, **194**:1-19.

- Anuradha R, Suresh AK, Venkatesh KV: **Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid.** *Process Biochemistry* 1999, **35**:367-375.
- Archibald FS, Fridovich I: Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* 1981a, **145**:442-451.
- Archibald FS, Fridovich I: Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 1981b, **146**:928-936.
- Atkinson B, Mavituna F: **Industrial microbial processes.** In *Biochemical engineering and biotechnology handbook 2nd edn.* Edited by Atkinson B, Mavituna F: Macmillan, New York; 1991:1181-1183.
- Audet P, Paquin C, Lacroix C: **Immobilized growing lactic acid bacteria with k-carrageenan-locust bean gum gel.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1988, **29**:11-18.
- B**
- Bai DM, Wei Q, Yan ZH, Zhao XM, Li XG, Xu SM: **Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid.** *Biotechnology Letters* 2003, **25**:1833-1835.
- Bai DM, Zhao XM, Li XG, Xu SM: **Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production.** *Biotechnology and Bioengineering* 2004, **88**:681-689.
- Bai ZW, Zhou YK: **A novel enzyme support derived from aminated silica gel and polysuccinimide: preparation and application for the immobilization of porcine pancreatic lipase.** *Reactive & Functional Polymers* 2004, **59**:93-98.
- Bakhtiari MR, Faezi MG, Fallahpour M, Noohi A, Moazami N, Amidi Z: **Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011.** *Process Biochemistry* 2006, **41**:547-551.
- Banerjee S, Anderson, F., Farber, G. K.: **The evolution of sugar isomerases.** *Protein Engineering* 1995, **8**:1189-1195.
- Bataillon M, Mathaly P, Nunes Cardinali A-P, Duchiron F: **Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale.** *Industrial crops and products* 1998, **8**:37 - 43.
- Bataillon M: **Isolement d'une souche thermophile xylanolytique et purification d'une endoxylanase. valorisation des hétéroxylanes du son de blé par hydrolyse enzymatique.** Thèse de Doctorat de l'Université de Reims et de l'INA P.G., France: 1998.
- Beasley S: **Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota:** Thèse de Doctorat, University of Helsinki, Finland: 2004.
- Beaugrand J: **Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre:** Thèse de Doctorat de l'Université de Reims, France: 2004.

-
- Belfaquih N, Penninckx MJ: **A bifunctional beta-xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10.** *Enzyme and Microbial Technology* 2000, **27**:114-121.
- Bellon V, Vigneau JL, Sevilla F: **Infrared and near-infrared technology for the food industry and agricultural uses: on-line applications.** *Food Control* 1994, **5**:21-27.
- Bergmans MEF, Beldman G, Gruppen H, Voragen AGJ: **Optimisation of the selective extraction of arabinoxylans from wheat bran: use of barium and calcium hydroxyde solution at elevated temperatures.** *Journal of Cereal Science* 1996, **23**:235 - 245.
- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV: **Molecular and industrial aspects of glucose isomerase.** *Microbiology Review* 1996, **60**:280-300.
- Bhowmik T, Steele JL: **Cloning, characterization and insertional inactivation of the *Lactobacillus helveticus* D(-) lactate dehydrogenase gene.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1994, **41**:432-439.
- Bianchi MM, Brambilla L, Protani F, Liu CL, Lievens J, Porro D: **Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous LDH gene.** *Applied and Environmental Microbiology* 2001, **67**:5621-5625.
- Bienfait CG, et al.: **Biotechnologie industrielle et chimie durable.** *Comité de l'Académie pour les Applications de la Science GT N°32.*
- Bimbenet JJ, Duquenoy A, Trystam G: *Génie des procédés alimentaires: des bases aux applications.* Edited by Dunod - RIA; 2002.
- Borgi MA, Srih-Belguith K, Ben Ali M, Mezghani M, Tranier S, Haser R, Bejar S: **Glucose isomerase of the *Streptomyces* sp. SK strain: purification, sequence analysis and implication of alanine 103 residue in the enzyme thermostability and acidotolerance.** *Biochimie* 2004, **86**:561.
- Boyaval P, Goulet J: **Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate-entrapped *Lactobacillus helveticus*.** *Enzyme and Microbial Technology* 1988, **10**:725-728.
- Brillouet JM, Joseleau JP, Utile JP, Lelievre D: **Isolation, purification, and characterization of a complex heteroxylan from industrial wheat bran.** *Journal of Agricultural Food Chemistry* 1982, **30**:488-495.
- Brillouet J-M, Joseleau J-P: **Investigation of the structure of a heteroxylan from the outer pericarp of wheat kernel.** *Carbohydrate research* 1987, **159**:109 - 126.
- Brown SH, Sjöholm C, Kelly RM: **Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*.** *Biotechnology and Bioengineering* 1993, **41**:878-886.
- Bryan EM, Bae T, Kleerebezem M, Dunny GM: **Improved vectors for nisin controlled expression in Gram-positive bacteria.** *Plasmid* 2000, **44**:183-190.
-

-
- Bryan JK: **Molecular weights of protein multimers from polyacrylamide gel electrophoresis.** *Analysis of multimeric protein* 1976:513-519.
- Brysk MM, Barlow E, Bell T, Rajaraman S, Stach RW: **Purification of proteins from polyacrylamide gels, free of detergent or dye.** *Preparative Biochemistry* 1988, **18**:217-225.
- Bucke C: **Industrial glucose isomerase.** In *Topics in enzyme and fermentation biotechnology: Industrial glucose isomerase.* Edited by (ed.) AW: Ellis Horwood; 1981:147-171. vol 1.
- Bustos G, Moldes AB, Cruz JM, Dominguez JM: **Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus pentosus*.** *Biotechnology Prog.* 2005, **21**:793-798.

C

- Callens M, Kersters-Hilderson H, Van Opstal O, De Bruyne CK: **Catalytic properties of -xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*.** *Enzyme and Microbial Technology* 1986, **8**:696.
- Caplice E, Fitzgerald GF: **Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.** *International Journal of Food Microbiology* 1999, **50**:131-149.
- Carrell HL, Rubin BH, Hurley TJ, Glusker JP: **X-ray crystal structure of D-xylose isomerase at 4-Å resolution.** *Journal of Biology and Chemistry* 1984, **259**:3230-3236.
- Carvalho W, Silva SS, Santos JC, Converti A: **Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems.** *Enzyme and Microbial Technology* 2003, **32**:553-559.
- Chaillou S, Bor YC, Batt CA, Postma PW, Pouwels PH: **Molecular cloning and functional expression in *Lactobacillus plantarum* 80 of xylT, encoding the D-xylose-H⁺ symporter of *Lactobacillus brevis*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1998, **64**:4720-4728.
- Champagne CP, Girard F, Rodrigue N: **Production of concentrated suspensions of thermophilic lactic acid bacteria in calcium alginate beads.** *International Dairy Journal* 1993, **3**:257-275.
- Chang C, Park BC, Lee DS, Suh SW: **Crystal Structures of Thermostable Xylose Isomerases from *Thermus caldophilus* and *Thermus thermophilus*: Possible Structural Determinants of Thermostability.** *Journal of Molecular Biology* 1999, **288**:623-634.
- Charalampopoulos D, Pandiella SS, Webb C: **Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates.** *Journal of Applied Microbiology* 2002, **92**:851-859.

- Chauhan K, Trivedi U, Patel KC: **Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCPO1 using date juice.** *Bioresource Technology* 2005.
- Chauthaiwale J, Rao M: **Production and purification of extracellular D-xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus* sp.** *Applied and Environmental Microbiology* 1994, **60**:4495-4499.
- Chen WP, Anderson AW: **Purification, immobilization, and some properties of glucose isomerase from *Streptomyces flavogriseus*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1979, **38**:1111-1119.
- Chenoll E, Macian MC, Aznar R: ***Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage.** *International Journal of Systematic Evolution Microbiology* 2006, **56**:449-452.
- Chevrier V, Dufour D, Fang Z, Helwaser P, Mannoury La Cour G, Pankow J, Vinot F: **L'offre pourra-t-elle satisfaire les besoins énergétiques du monde? Rapport de l'Ecole Nationale d'Administration - Promotion Copernic** 2001.
- Chiarini L, Mara L, Tabacchioni S: **Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, **36**:461- 464.
- Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Guegeun M, Vernoux J-P: **Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products.** *Lait* 2003, **83**:269-306.
- Couto SR, Sanroman MA: **Application of solid-state fermentation to food industry—A review.** *Journal of Food Engineering* 2006, **76**:291-302.

D

- Datta R, Tsai S-P, Bonsignore P, Moon S-H, Frank JR: **Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives.** *FEMS Microbiology Review* 1995, **16**:221-231.
- Davidson BE, Kordias N, Dobos M, Hillier AJ: **Genomic organization of lactic acid bacteria.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996, **70**:161-183.
- De Muynck C, Beauprez J, Soetaert W, Vandamme EJ: **Boric acid as a mobile phase additive for high performance liquid chromatography separation of ribose, arabinose and ribulose.** *Journal of Chromatography A* 2006, **1101**:115-121.
- De Vos WM, Hugenholtz J: **Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria.** *Trends Biotechnology* 2004, **22**:72-79.

- De Vos WM, Simons G: **Gene cloning and expression systems in *Lactococci***. In *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria*. Edited by Gasson MJ dVW, editors. Chapman & Hall: Glasgow, UK; 1994:52-105.
- Delgenes JP, Moletta R, Navarro JM: **Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae***. *Enzyme and Microbial Technology* 1996, **19**:220-225.
- Dellaglio F, de Roissard H, Torriani S, Curk MC, Janssens D: **Caractéristiques générales des bactéries lactiques**. In *Bactéries lactiques*. Edited by Uriage. DRHeLFel; 1994:25-116. vol 1.
- Demirel D, Ozdural AR, Mutlu M: **Preparation and characterization of magnetic duolite-polystyrene composite particles for enzyme immobilization**. *Journal of Food Engineering* 2004, **62**:203-208.
- Dequin S, Barre P: **Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH**. *Biotechnology (N Y)* 1994, **12**:173-177.
- Deshmukh SS, Deshpande MV, Shankar V: **Medium optimization for the production of glucose isomerase from thermophilic *Streptomyces thermonitrificans***. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 1994, **10**:264-267.
- Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW: **Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **63**:258-266.
- Ding S, Tan T: **L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies**. *Process Biochemistry* 2006, **41**:1451-1454.
- Dische Z, Borenfreund E: **A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses**. *Journal of Biology and Chemistry* 1951, **192**:583 - 587.
- Doleyres Y: **production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées**: Thèse de Doctorat, Université de Laval, Québec: 2003.

E

- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S: **Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis**. *Current Opinion in Microbiology* 2001, **42**:199-202.
- Erlanson KA, Park JH, Wissam El K, Kao HH, Basaran P, Brydges S, Batt CA: **Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis***. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**:3974-3980.

F

- Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD: **Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999, **49** Pt 1:217-221.
- Feillet P: *Le grain de blé - composition et utilisation*; INRA Editions; 2000.
- Feldmann SD, Sahm, H, Sprenger, GA: **Cloning and expression of the genes for xylose isomerase and xylulokinase from *Klebsiella pneumoniae* 1033 in *Escherichia coli* K12.** *Molecular Genomic and Genetic* 1992, **234**:201-210.
- Ferain T, Garmyn D, Bernard N, Hols P, Delcour J: ***Lactobacillus plantarum* IdhL gene: overexpression and deletion.** *Journal of Bacteriology* 1994, **176**:596-601.
- Fitzpatrick JJ, O'Keeffe U: **Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid.** *Process Biochemistry* 2001, **37**:183-186.
- Flashel E, Bott M, Buchholtz S, Daußmann T, Gent R, Liese A, Renken E, Reuss M, Scriba A, Sell D, et al.: **White Biotechnology: Opportunities for Germany.** *Position Paper of DECHEMA e.v.* 2004.

G

- Gabriel O, Gersten D: **Staining for enzymatic activity after gel electrophoresis.** *Analytical Biochemistry* 1992, **203**:1-21.
- Gabriel O, Wang SF: **Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels - I. Enzymes catalyzing the conversion of nonreducing substrates to reducing products.** *Analytical Biochemistry* 1969, **27**:545-554.
- Gaikwad SM, Rao M, Deshpande V: **Structure-function relationship of glucose/xylose isomerase from *Streptomyces*: evidence for the occurrence of inactive dimer.** *Enzyme and Microbial Technology* 1992, **15**:155-157.
- Garde A, Jonsson G, Schmidt AS, Ahring BK: **Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*.** *Bioresource Technology* 2002, **81**:217-223.
- Goksungur Y, Guvenc U: **Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *L. delbrueckii* IFO 3202 batch and continuous.** *Journal of Chemistry Engineering and Biotechnology* 1999, **74**:131-136.
- Goncalves LMD, Barreto MTO, Xavier AMBR, Carrondo MJT, Klein J: **Inert supports for lactic acid fermentation—a technological assessment.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, **38**:305-311.

- Gonzalez MI, Ivarez SAA, Riera FA, Ivarez RAA: **Purification of Lactic Acid from Fermentation Broths by Ion-Exchange Resins.** *Industrial Engineering Chemistry Research* 2006, **45**:3243-3247.
- Guoqiang D, Kaul R, Mattiasson B: **Immobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material pretreated with polyethylenimine.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1992, **37**:305-310.
- Guoqiang D, Kaul R, Mattiasson B: **Evaluation of alginate immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production.** *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 1991, **36**:309-314.

H

- Hafner EW, Jackson DM: **Constitutive glucose isomerase producer.** US Patent 1985.
- Hamelinck CN, Hooijdonk G, Faaij A: **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term.** *Biomass and bioenergy* 2005, **28**:384-410.
- Hanko VP, Rohrer JS: **Determination of Carbohydrates, Sugar Alcohols, and Glycols in Cell Cultures and Fermentation Broths Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.** *Analytical Biochemistry* 2000, **283**:192-199.
- Heath EC, Horecker BL, Smyrniotis PZ, Takagi Y: **Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. II. L-Arabinose isomerase.** *Journal of Biology and Chemistry* 1958, **231**:1031-1037.
- Hess JM, Tchernajenko V, Vieille C, Zeikus JG, Kelly RM: ***Thermotoga neapolitana* homotetrameric xylose isomerase is expressed as a catalytically active and thermostable dimer in *Escherichia coli*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1998, **64**:2357-2360.
- Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B: **Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1).** *Enzyme Microbiology and Technology* 2000, **26**:87-107.
- Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U: **Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2001, **73**:365S-373S.
- Horwath RO: **High temperature isomerization process.** US Patent 1986.

I

- Ibrahim OO, Spradlin JE: US Patent 2000.

- Idris A, Suzana W: **Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii***. *Process Biochemistry* 2006, **41**:1117-1123.
- Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, Nagamori E, Matsuyama T, Kitamoto K, Takahashi H: **Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene**. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**:1964-1970.
- Ishida N, Suzuki T, Tokuhiko K, Nagamori E, Onishi T, Saitoh S, Kitamoto K, Takahashi H: **D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2006, **101**:172-177.
- Izumori K, Ueda Y, Yamanaka K: **Pentose metabolism in *Mycobacterium smegmatis*: comparison of L-arabinose isomerase induced by L-arabinose and D-galactose**. *Journal of Bacteriology* 1978, **133**:413-414.
- J**
- Jackson S, Nicolson SW: **Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 2002, **131**:613-620.
- Jeppsson H, Yu S, Hahn-Hägerdal H: **Xylulose and Glucose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in Chemostat Culture**. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, **62**:1705-1709.
- Jin B, Yin P, Ma Y, Zhao L: **Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2005, **32**:678-686.
- John RP, Nampoothiri KM, Pandey A: **Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii***. *Process Biochemistry* 2006, **41**:759-763.
- Jokela J, Pastinen O, Leisola M: **Isomerization of pentose and hexose sugars by an enzyme reactor packed with cross-linked xylose isomerase crystals**. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, **31**:67-76.
- Joo GJ, Shin S, Heo GY, Kim YM, Rhee IK: **Molecular cloning and expression of a thermostable xylose (glucose) isomerase gene, *xylA*, from *Streptomyces chibaensis* J-59**. *Journal of Microbiology* 2005, **43**:34-37.
- Jørgensen F, Hansen OC, Stougaard P: **Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: heterologous expression and characterisation of a thermostable L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **64**:816-822.

Joseleau JP, Comtat J, Ruel K: **Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls.** In *Xylans and Xylanases*. Edited by Visser J. BG, A.K.-v. S.M., et Voragen A.G.: Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands; 1992:1-15. vol 7.

Josson K, Scheirlinck T, Michiels F, Platteeum C, Stanssens P, Joos H, *et al.*: **Characterization of a Gram-positive broad host range plasmid isolated from *Lactobacillus hilgardii*.** *Plasmid* 1989, **21**:9-20.

K

Kadam SR, Patil SS, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV: **Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production.** *Process Biochemistry* 2005, **In Press**.

Kandler O, Weiss N: **Genus *Lactobacillus*.** In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath NSM, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.; 1986:1209-1234. vol 2.

Kawai Y, Konishi H, Horitsu H, Sakurai H, Takamizawa K, Suzuki T, Kawai K: **Purification and characterization of D-xylose isomerase from *Bifidobacterium adolescentis*.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 1994, **58**:691-694.

Khlebnikov A, Risa Ø, Skaug T, Carrier TA, Keasling JD: **Regulatable Arabinose-Inducible Gene Expression System with Consistent Control in All Cells of a Culture.** *Journal of Bacteriology* 2000, **182**: 7029-7034.

Kim BC, Lee YH, Lee HS, Lee DW, Choe EA, Pyun YR: **Cloning, expression and characterization of L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*: bioconversion of D-galactose to D-tagatose using the enzyme.** *FEMS Microbiology Letters* 2002, **212**:121-126.

Kim P, Yoon SH, Roh HJ, Choi JH: **High production of D-tagatose, a potential sugar substitute, using immobilized L-arabinose isomerase.** *Biotechnology Progress* 2001, **17**:208-210.

Klaenhammer TR: **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** *Biochimie* 1988, **70**:337-349.

Klinkerberg G, Lystad KQ, Levine DW, Dyrset N: **Cell release from alginate immobilized *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* in chitosan and alginate coated beads.** *Journal of Dairy Science* 2001, **84**:1118-1127.

Köpfer S, Freimund S: **The Composition of Keto Aldoses in Aqueous Solution as Determined by NMR Spectroscopy.** *Helvetica Chimica Acta* 2003, **86**:827-843.

Krischke W, Schröder M, Trösch W: **Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1991, **34**:573-578.

- Kulka RG: **Colorimetric estimation of ketopentoses and ketohexoses.** *Biochemistry Journal* 1956, **63**:542-548.
- Kuyper M, Harhangi HR, Stave AK, Winkler AA, Jetten MS, de Laat WT, den Ridder JJ, Op den Camp HJ, van Dijken JP, Pronk JT: **High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*?** *FEMS Yeast Research* 2003, **4**:69-78.
- Kuyper M, Hartog MMP, Toirkens MJ, Almering MJH, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT: **Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation.** *FEMS Yeast Research* 2005, **5**:399-409.
- Kwon HJ, Kitada M, Horikoshi K: **Purification and properties of the D-xylose isomerase from alkalophilic *Bacillus* No. KX-6.** *Agric Biol Chem* 1987, **51**:1983-1989.
- Kwon HS, Yang EH, Yeon SW, Kang BH, Kim TY: **Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA.** *FEMS Microbiology Letters* 2004, **239**:267-275.
- L**
- Ladrat C: **Mise en évidence et étude de deux enzymes thermostables de microorganismes thermophiles isolés d'écosystèmes hydrothermaux sous-marins.**: Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne, France: 1993.
- Lama L, Nicolaus B, Calandrelli V, Romano I, Basile R, Gambacorta A: **Purification and characterization of thermostable xylose(glucose) isomerase from *Bacillus thermoantarcticus*.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2001, **27**:234-240.
- Lee CY, Bagdasarian M, Meng MH, Zeikus JG: **Catalytic mechanism of xylose (glucose) isomerase from *Clostridium thermosulfurogenes*.** Characterization of the structural gene and function of active site histidine. *Journal of Biology and Chemistry* 1990, **265**:19082-19090.
- Lee DW, Jang HJ, Choe EA, Kim BC, Lee SJ, Kim SB, Hong YH, Pyun YR: **Characterization of a thermostable L-arabinose (D-galactose) isomerase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**:1397-1404.
- Lee DW, Choe EA, Kim SB, Eom SH, Hong YH, Lee SJ, Lee HS, Lee DY, Pyun YR: **Distinct metal dependence for catalytic and structural functions in the L-arabinose isomerases from the mesophilic *Bacillus halodurans* and the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*.** *Archive of Biochemistry and Biophysics* 2005, **434**:333-343.
- Lee J: **Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol.** *Journal of Biotechnology* 1997, **56**:1-24.

- Lee KB: **A media design program for lactic acid production coupled with extraction by electro dialysis.** *Bioresource Technology* 2005, **96**:1505-1510.
- Lee YC: **Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography.** *Journal of Chromatography A* 1996, **720**:137-149.
- Lehmacher A, Bisswanger H: **Comparative kinetics of D-xylose and D-glucose isomerase activities of the D-xylose isomerase from *Thermus aquaticus* HB8.** *Biology and Chemistry* 1990, **371**:527-536.
- Liao J, Xu C, Yang YH, Li H, Cheng Y, Chen CL, Zhu GP, Niu LW, Wang YZ: **Glucose isomerase gene knock-out by denatured double-stranded DNA.** *Yi Chuan Xue Bao* 2000, **27**:449-454.
- Lichtenthaler FW: **Carbohydrates.** In *Encyclopedia of industrial chemistry - 6th ed.* Edited by Lichtenthaler FW: Ulmann's; 2002:1-45. vol 1.
- Lidbeck A, Nord CE: ***Lactobacilli* and the normal human anaerobic microflora.** *Clinical Infectious Disease* 1993, **16**:181-187.
- Litchfield JH: **Microbiological production of lactic acid.** *Advance Applied Microbiology* 1996, **42**:45-95.
- Liu SY, Wiegel J, Gherardini FC: **Purification and cloning of a thermostable xylose (glucose) isomerase with an acidic pH optimum from *Thermoanaerobacterium* strain JW/SL-YS 489.** *Journal of Bacteriology* 1996, **178**:5938-5945.
- Lokman BC, van Santen P, Verdoes JC, Kruse J, Leer RJ, Posno M, Pouwels PH: **Organization and characterisation of three genes involved in D-xylose catabolism in *Lactobacillus pentosus*.** *Molecular Genomic and Genetic* 1991, **230**:161-169.
- Lorenz P, Zinke H: **White biotechnology: differences in US and EU approaches?** *Trends Biotechnology* 2005, **23**:570-574.
- Lunt J: **Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers.** *Polymer Degradation and Stability* 1998, **59**:145-152.
- Luo C, Brink DL, Blanch HW: **Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol.** *Biomass and Bioenergy* 2002, **22**:125-138.

M

- Magnuson JK, Lasure LL: **Organic Acid Production by Filamentous Fungi.** In *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine.* Edited by Jan and Lene Lange Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004:307-340.
- Marshall RO, Kooi ER: **Enzymatic conversion of o-glucose to o-fructose.** *Science* 1957, **125**:648-649.

- McCammon SA, Innes BH, Bowman JP, Franzmann PD, Dobson SJ, Holloway PE, Skerratt JH, Nichols PD, Rankin LM: **Flavobacterium hibernum** sp. nov., a lactose-utilizing bacterium from a freshwater Antarctic lake. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1998, **48**:1405-1412.
- Meaden PG, Aduse-Opoku J, Reizer J, Reizer A, Lanceman YA, Martin MF, Mitchell WJ: **The xylose isomerase-encoding gene (xylA) of Clostridium thermosaccharolyticum: cloning, sequencing and phylogeny of XylA enzymes.** *Gene* 1994, **141**:97-101.
- Meng M, Bagdasarian M, Zeikus JG: **The role of active-site aromatic and polar residues in catalysis and substrate discrimination by xylose isomerase.** *Proc National Academic Science USA* 1993, **90**:8459-8463.
- Mercenier A, Muller-Alouf H, Grangette C: **Lactic acid bacteria as live vaccines.** *Current Issues in Molecular Biology* 2000, **2**:7-25.
- Miller TL, Churchill BW: **Substrate for large scale fermentation.** *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* 1986.
- Miura S, Arimura T, Hoshino M, Kojima M, Dwiarti L, Okabe M: **Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain Rhizopus sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2003, **96**:65-69.
- Miura S, Dwiarti L, Arimura T, Hoshino M, Tiejun L, Okabe M: **Enhanced production of L-lactic acid by ammonia-tolerant mutant strain Rhizopus sp. MK-96-1196.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004, **97**:19-23.
- Moneke AN, Obi SKC, Bisswanger H: **D-Xylose isomerases from a newly isolated strain, Paenibacillus sp., and from Alcaligenes ruhandii: isolation, characterization and immobilisation to solid supports.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1998, **50**:552-557.
- Morotomi M, Yuki N, Kado Y, Kushiro A, Shimazaki T, Watanabe K, Yuyama T: **Lactobacillus equi** sp. nov., a predominant intestinal *Lactobacillus* species of the horse isolated from faeces of healthy horses. *International Journal of Systematic Evolution and Microbiology* 2002, **52**:211-214.
- Mota RM, Moreira JLS, Souza MR, Horta MF, Teixeira SMR, Neumann E, Nicoli JR, Nunes AC: **Genetic transformation of novel isolates of chicken Lactobacillus bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines.** *BMC Biotechnology* 2006, **6**:1-11.
- Myers A, Matthew M, James M, Ball S: **Recent progress toward understanding biosynthesis of the amlopectin crystal.** *Plant Physiology* 2000, **122**:989-1007.

N

- Nagazawa T, Yamada H: **Microbial production of commodity chemical.** *Pure & Applied Chemistry.* 1995, **67**:1241-1256.

- Nakamatu T, Yamanaka K: **Crystallization and properties of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii***. *Biochemistry and Biophysics Acta* 1969, **178**:156-165.
- Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J: **Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus***. *Bioresource Technology* 2005, **96**:63-67.
- Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A: **L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization**. *Journal of Biotechnology* **7**:168-179.
- Naveena BJ, Altaf M, Bhadrariah K, Reddy G: **Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran**. *Bioresource Technology* 2005, **96**:485-490.
- Nikkila KK, Hujanen M, Leisola M, Palva A: **Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid**. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**:3835-3841.

O

- Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macías ME: **Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina**. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999, **23**:87-92.
- Oh H, Wee YJ, Yun JS, Han SH, Jung S, Ryu HW: **Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials**. *Bioresource Technology* 2005, **96**:1492-1498.
- Ohashi R, Yamamoto T, Suzuki T: **Continuous Production of Lactic Acid from Molasses by Perfusion Culture of *Lactococcus lactis* Using a Stirred Ceramic Membrane Reactor**. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 1999, **87**:647-654.
- Ohkouchi Y, Inoue Y: **Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011**. *Bioresource Technology* 2006 **97**:1554-1562
- Orla-Jensen S: **The lactic acid bacteria**. *Copenhagen: Anhr Fred Host and Son* 1919.
- Orrhage K, Nord CE: ***Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in human health**. *Drugs Experience and Clinical Research* 2000, **26**:95-111.

P

- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B: **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition**. *Bioresource technology* 2000, **74**:25-33.
- Pascual LM, Daniele MB, Pajaro C, Barberis L: ***Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance**. *Contraception* 2006, **73**:78-81.

-
- Pastinen O, Visuri K, Schoemaker HE, Leisola M: **Novel reactions of xylose isomerase from *Streptomyces rubiginosus***. *Enzyme and Microbial Technology* 1999, **25**:695-700.
- Pasty JC: **Les débouchés non alimentaires des produits agricoles: un enjeu pour la France et l'Union Européenne**. *Conseil économique et social* 2004.
- Patrick J, Lee N: **L-arabinose isomerase**. *Methods Enzymology* 1975, **41**:453-458.
- Persson P, Andersson J, Gorton L, Larsson S, Nilvebrant NO, Jonsson LJ: **Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol**. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 2002, **50**:5318-5325.
- Plackett RL, Burman JP: **The design of optimum multifactorial experiments**. *Biometrika* 1944, **33**: 305-325.
- Pomeranz Y: **Cereal Crops - general**. In *Modern cereal science and technology*. Edited by Pullman W.A.: VCH publishers, New-York, USA; 1987:14-23.
- Porro D, Bianchi MM, Brambilla L, Menghini R, Bolzani D, Carrera V, *et al.*: **Replacement of a metabolic pathway for large-scale production of lactic acid from engineered yeasts**. *Applied and Environmental Microbiology* 1999, **65**:4211-4215.
- Porro D, Brambilla L, Ranzi BM, Martegani E, Alberghina L: **Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid**. *Biotechnology Progress* 1995, **11**:294-298.

Q

- Qiabi A, Rigal L, Gaset A: **Comparative studies of hemicellulose hydrolysis processes application to various lignocellulosic wastes**. *Industrial Crops and Production* 1994, **3**:95-102.

R

- Raynal-Ioualalen R: **Procédé de fractionnement des sons de blé. Extraction et étude des propriétés fonctionnelles des arabinoxylanes**.: Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France: 1996.
- Reimann W: **Downstreaming of Lactic Acid from Hydrolysate of Rye after Fermentation**. *Agricultural Engineering International* 2005, **3**:1-15.
- Richard P, Verho R, Putkonen M, Londesborough J, Penttila M: **Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway**. *FEMS Yeast Research* 2003, **3**:185-189.
- Richter K, Träger A: **L(+)-Lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid-state fermentations**. *Acta Biotechnology* 1994, **14**:367-378.
-

- Rogosa M, Franklin JG, Perry KD: **Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical characters of *Lactobacillus* subsp.** *Journal of General Microbiology* 1961, **24**:473- 482.
- Rohella RS, Sahoo N, Paul SC, Choudhury S, Chakravortty V: **Thermal studies on isolated and purified lignin.** *Thermochemica Acta* 1996, **287**:131-138.
- Roller M: **Valorisation non alimentaire des co-produits du blé: contribution à l'extraction et à la purification d'hexoses et de pentoses en vue de la synthèse de polyglucosides d'alkyles:** Thèse de doctorat de l'INA P.G.: 1999.
- Roukas T, Kotzekidou P: **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* 1998, **22**:199-204.

S

- Sa-Nogueira I, Nogueira TV, Soares S, Lencastre H: **The *Bacillus subtilis* L-arabinose (ara) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression.** *Microbiology* 1997, **143**: 957-969.
- Saha B, Bothast R: **Enzymes in lignocellulosic biomass conversion.** *Fuels and Chemicals from Biomass. Washington, D.C.* 1997:46-56.
- Saha BC: **Hemicellulose bioconversion.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003, **30**:279-291.
- Saitoh S, Ishida N, Onishi T, Tokuhiko K, Nagamori E, Kitamoto K, Takahashi H: **Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity.** *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**:2789-2792.
- Salmén L: **Micromechanical understanding of the cell-wall structure.** *C. R. Biologies - Plant biology and pathology / Biologie et pathologie végétales* 2004, **327**:873-880.
- Salminen S, Deighton MA, Benno Y, Gorbach SL: **Lactic acid bacteria in health and disease.** In *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects, 2nd ed.* Edited by Salminen S VWA, eds.; 1998:211-253.
- Sa-Nogueira I, Nogueira TV, Soares S, de Lencastre H: **The *Bacillus subtilis* L-arabinose (ara) operon: nucleotide sequence, genetic organization and expression.** *Microbiology* 1997, **143**:957-969.
- Sapunova LI, Lobanok AG, Kazakevich IO, Evtushenkov AN: **A Plate Method to Screen for Microorganisms Producing Xylose Isomerase.** *Microbiology* 2004, **73**:107-112.
- Sapunova LI, Lobanok AG, Parakhnia EV, Kazakevich IO: **Xylose(glucose) isomerase reactivity of immobilized *Arthrobacter* sp.** *Mikrobiologiya* 2003, **72**:395-399.

-
- Sarkanen KV: **Lignin precursors and their polymerization**. In **Lignin: Occurrence, formation, structure and reactions**. Edited by Sarkanen KV, Ludwig CH: Wiley-Interscience, New-York; 1971:95-163.
- Saudagar PS, Singhal RS: **Curdlan as a support matrix for immobilization of enzyme**. *Carbohydrate Polymers* 2004, **56**:483-488.
- Saulnier L, Marot C, Chanliaud E, Thibault JF: **Cell wall polysaccharide interactions in maize bran**. *Carbohydrate polymers* 1995, **26**:279-287.
- Schaafsma G: **State of the art concerning probiotic strains in milk products**. *International Dairy Fed. Nutrition News* 1996, **5**:23-24.
- Scheler A, Rygus T, Allmansberger R, Hillen W: **Molecular cloning, structure, promoters and regulatory elements for transcription of the *Bacillus licheniformis* encoded regulon for xylose utilization**. *Archive of Microbiology* 1991, **155**:526-534.
- Schellenberg GD, Sarthy A, Larson AE, Backer MP, Crabb JW, Lidstrom M, Hall BD, Furlong CE: **Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene**. *Journal of Biology and Chemistry* 1984, **259**:6826-6832.
- Schenk M, Bisswanger H: **A microplate assay for d-xylose/d-glucose isomerase**. *Enzyme and Microbial Technology* 1998, **22**:721.
- Selmer-Olsen E, Sorhaug T: **Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract**. *Milchwissenschaft* 1998, **53**:367-370.
- Senthuran A, Senthuran V, Hatti-Kaul R, Mattiasson B: **Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization**. *Journal of Biotechnology* 1999, **73**:61-70.
- Senthuran A, Senthuran V, Mattiasson B, Kaul R: **Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei***. *Biotechnology and Bioengineering* 1997, **55**:841-853.
- Shallom D, Shoham Y: **Microbial hemicellulases**. *Current Opinion in Microbiology* 2003, **6**:219-228.
- Shiiba K, Yamada H, Hara H, Okada K, Nagao S: **Purification and characterization of two arabinoxylans from wheat bran**. *American Association of Cereal Chemists* 1993, **70**:209-214.
- Shukla VB, Zhou S, Yomano LP, Shanmugam KT, Preston JF, Ingram LO: **Production of D(-)-lactate from sucrose and molasses**. *Biotechnology Letters* 2004, **26**:689-693.
- Singh SK, Ahmed SU, A. P: **Metabolic engineering approaches for lactic acid production**. *Process Biochemistry* 2006, **41**:991-1000.
- Skoet G, Guertler H: **Xylose isomerase (glucose isomerase) from *Streptomyces murinus* cluster**. US Patent 1987.
-

-
- Skory CD: **Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae***. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, **66**:2343-2348.
- Skory CD: **Lactic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene**. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003, **30**:22-27.
- Skory CD: **Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, **64**:237-242.
- Smith CA, Rangarajan M, Hartley BS: **D-Xylose (D-glucose) isomerase from *Arthrobacter* strain N.R.R.L. B3728. Purification and properties**. *Biochemistry J* 1991, **277** (Pt 1):255-261.
- Socol CR, Marin B, Lebeault JM, Raimbault M: **Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1994, **41**:286-290.
- Södergard A, Stolt M: **Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition**. *Progress Polymer Science* 2002, **27**:1123-1163.
- Sonne-Hansen J, Mathrani IM, Ahring BK: **Xylanolytic anaerobic thermophiles from Icelandic hot-springs**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993, **38**:537-541.
- Sreenath HK, Jeffries TW: **Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts**. *Bioresource Technology* 2000, **72**:253-260.
- Sreenath HK, Moldes AB, Koegel RG, Straub RJ: **Lactic acid production from agriculture residues**. *Biotechnology Letters* 2001, **23**:179-184.
- Stassin F, Lienard L: **La biotechnologie blanche: une opportunité pour l'industrie chimique?** In *NATISS (Nature for Innovative & Sustainable Solutions)*: 2005.
- Stiles ME, Holzapfel WH: **Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy**. *International Journal of Food Microbiology* 1997, **36**:1-29.
- Sun JX, Sun XF, Zhao H, Sun RC: **Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse**. *Polymer Degradation and Stability* 2004, **84**:334-339.
- Sun RC, Hughes S: **Fractional extraction and physico-chemical characterization of hemicelluloses and cellulose from sugar beet pulp**. *Carbohydrate Polymers* 1998, **36**:293-299.
- Sun RC, Tomkinson J, Wang SQ, Zhu W: **Characterization of lignins from wheat straw by alkaline peroxide treatment**. *Polymer Degradation and Stability* 2000, **67**:101-109.
- Sun RC, Tomkinson J: **Characterization of hemicelluloses obtained by classical and ultrasonically assisted extractions from wheat straw**. *Carbohydrate Polymers* 2002, **50**:263-271.
-

Sun X, Wang Q, Zhao W, Ma H, Sakata K: **Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method.** *Separation and Purification Technology* 2006, **49**:43-48.

Sun XF, Xu F, Sun RC, Fowler P, Baird MS: **Characteristics of degraded cellulose obtained from steam-exploded wheat straw.** *Carbohydrate Research* 2005, **340**:97-106.

Sun XF, Xu F, Sun RC, Geng ZC, Fowler P, Baird MS: **Characteristics of degraded hemicellulosic polymers obtained from steam exploded wheat straw.** *Carbohydrate Polymers* 2005, **60**:15-26.

T

Taqieddin E, Amiji M: **Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules.** *Biomaterials* 2004, **25**:1937-1945.

Tay A, Yang ST: **Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor.** *Biotechnology and Bioengineering* 2002, **80**:1-12.

Teleyadi S, Cheryan M: **Lactic acid production from cheese whey permeate, Production and economics of continuous membrane bioreactor.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1995, **43**:242-248.

Timbuntam W, Sriroth K, Tokiwa Y: **Lactic acid production from sugar-cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp.** *Biotechnology Letters* 2006, **28**:811-814.

Tomoyeda M, Horitsu H: **Pentose metabolism by *Candida utilis*. I. Xylose isomerase.** *Agricultural Biology and Chemistry* 1964, **28**:139-143.

Torget R, Hatzis C, Hayward TK, Hsu TA, Philippidis GP: **Optimization of reverse-flow, two temperatures, dilute acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1996, **57-58**:85-101.

V

van Maris AJ, Geertman JM, Vermeulen A, Groothuizen MK, Winkler AA, Piper MD, van Dijken JP, Pronk JT: **Directed evolution of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*, yielding a C2-independent, glucose-tolerant, and pyruvate-hyperproducing yeast.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**:159-166.

van Maris AJ, Winkler AA, Porro D, van Dijken JP, Pronk JT: **Homofermentative lactate production cannot sustain anaerobic growth of engineered *Saccharomyces cerevisiae*: possible consequence of energy-dependent lactate export.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**:2898-2905.

-
- van Niel EWJ, Hahn-Hägerdal B: **Nutrient requirements of *Lactococci* in defined growth media.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, **52**:617-627.
- Vartak HG, Srinivasan MC, Powar VK, Rele MV, Khire JM: **Characterization of extracellular substrate specific glucose and xylose isomerases of *Chainia*.** *Biotechnology Letters* 1984, **6**:493-494.
- Venkatesh KV: **Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid.** *Bioresource Technology* 1997, **62**:91-98.
- Vickroy TB: **Lactic acid.** In *The practice of biotechnology: commodity products*. Edited by Blanch HW DS, Wang DIC (eds): Pergamon Press, Elmsford, NY; 1985:761-776. vol 3.
- Vieille C, Hess JM, Kelly RM, Zeikus JG: **xylA cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1995, **61**:1867-1875.
- Vieille C, Epting KL, Kelly RM, Zeikus JG: **Bivalent cations and amino acid composition contribute to the thermostability of *Bacillus licheniformis* xylose isomerase.** *European Journal of Biochemistry* 2001, **268**:6291-6301.
- Visuri K: **Cross-linked glucose isomerase.** US Patent 1999.
- Vongsuvanlert V, Tani Y: **Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose.** *Agricultural Biology and Chemistry* 1988, **52**:1817-1824.

W

- Weber P: **Fructose by isomerisation of glucose.** US Patent November 1976.
- Wee YJ, Yun JS, Park DH, Ryu HW: **Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*.** *Biotechnology Letters* 2004, **26**:71-74.
- Weeks J, Yuksel GU: **Molecular characterization of two lactate dehydrogenase genes with a novel structural organization on the genome of *Lactobacillus* sp. strain MONT4.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**:6290-6295.
- Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ: **Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids.** *Current Opinion in Microbiology* 2006, **9**:268-274.
- Wiseman A: *Handbook of enzyme biotechnology*. Ellis Horwood Ltd., Chichester, United Kingdom; 1975.
- Witte V, Krohn U, Emeis CC: **Characterisation of yeast with high L(f)-lactic acid production: lactic acid specific soft agar overlay (LASSO) and TAFE-patterns.** *Journal of Basic Microbiology* 1989, **29**:707-716.

Wyman CE: *Handbook on bioethanol: production and utilization*. Edited by Wyman CE. Washington: Taylor & Francis, 1st Ed; 1996.

Y

Yamanaka K: Purification, crystallization and properties of the D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 1968, **151**:670.

Yamanaka K: D-xylose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Analytical Biochemistry* 1971.

Yamanaka K: L-arabinose isomerase from *Lactobacillus gayonii*. *Methods in Enzymology* 1975, **41**:458-461.

Yamanaka K, Takahara N: Purification and properties of D-xylose isomerase from *Lactobacillus xylosus*. *Agricultural Biology and Chemistry* 1977, **41**:1909-1915.

Yamanaka K, Izumori K: D-arabinose (L-fucose) isomerase from *Aerobacter aerogenes*. *Methods in Enzymology* 1975, **41**:462-465.

Yamanaka K, Wood WA: L-Arabinose isomerase. *Methods in Enzymology* 1966, **9**:596-602.

Yan XL, Khor E, Lim LY: Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights. *Journal of Biomedical Material Research* 2001, **58**:358-365.

Yanez R, Moldes AB, Alonso JL, Parajo JC: Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnology Letters* 2003, **25**:1161-1164.

Yang SY, Ji KS, Baik YH, Kwak WS, McCaskey TA: Lactic acid fermentation of food waste for swine feed. *Bioresource Technology* 2006, **97**:1858-1864.

Yin PM, Yabiro K, Ishigaki T, Park YS, Okabe M: L(+)-Lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in airlift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1998, **85**:96-100.

Yoo IK, Chang HN, Lee EG, Chang YK, Moon S-H: Byproduct formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*. *Biotechnology Letters* 1997, **19**:237- 240.

Yoo IK, Seong GH, Chang HN, Park JK: Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology* 1996, **19**:428-433.

Youssef CB, Goma G, Olmos-Dichara A: Kinetic modelling of *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* growth and lactic acid production in batch cultures under various medium conditions. *Biotechnology Letters* 2005, **27**:1785-1789.

Yuan JP, Chen F: Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Food Chemistry: Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section* 1999, **64**:423-427.

Z

- Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO: **Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110.** *Applied and Environmental Microbiology* 2003, **69**:399-407.
- Zhou S, Grabar TB, Shanmugam KT, Ingram LO: **Betaine Tripled the Volumetric Productivity of D: (-)-lactate by *Escherichia coli* Strain SZ132 in Mineral Salts Medium.** *Biotechnology Letters* 2006, **28**:671-676.
- Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO: **Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(-)-lactate dehydrogenase gene (ldhA) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (ldhL) from *Pediococcus acidilactici*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2003, **69**:2237-2244.
- Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Grabar TB, Ingram LO: **Fermentation of 12% (w/v) Glucose to 1.2 M: Lactate by *Escherichia coli* Strain SZ194 using Mineral Salts Medium.** *Biotechnology Letters* 2006, **28**:663-670.
- Zhu L, Li W, Dong X: **Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov.** *International Journal of Systematic Evolution of Microbiology* 2003, **53**:1619-1623.

Ressources électroniques

- ADEME (colloque): **Produits renouvelables, vers un nouvel âge d'or du végétal.** <http://www.ademe.fr/partenaires/agriculture> 2002.
- Batt CA: ***Lactobacillus*.** <http://www.foodscience.cornell.edu/fs406/LACTOBACILLUS.doc> 1999.
- Energy Information Administration (EIA): **U.S. Crude Oil, Natural Gas, and Natural Gas Liquids Reserves.** <http://www.eia.doe.gov/iea/2003>.
- EIA: **World oil markets.** <http://www.eia.doe.gov/emeu/oiaf/aeo/2004>.
- Euzéby JP: **Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.** <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/> 2006.
- Fontaine N: **Livre blanc sur les énergies.** <http://www.debat-energie.gouv.fr> 2003.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): http://www.fao.org/es/ess/sumfas/sumfas_fr_web.pdf 2005.
- Ministère de l'écologie et du développement durable et le Ministère interministérielle de l'effet de serre: **Plan climat 2004.** <http://www.ecologie.gouv.fr> ou <http://www.effet-de-serre.gouv.fr> 2004.
- Protocole de Kyoto: **Convention cadre des Nations Unies sur les changements climatiques.** <http://www.unfccc.int/resource/docs/convkp/kpfrench.pdf> 1997.

OCDE: **Évolution des prix du pétrole: moteurs, conséquences économiques et ajustement des politiques.** In *Perspectives économiques de l'OCDE*. 2004. vol 76.

Schaaf J: **Thinking biorenewables? Think corn!** <http://www.usda.gov/oce/forum/2006%20Speeches/PDF%20speech%20docs/Schaaf223.pdf> 2006.

TOTAL: **Les chemins du développement durable.** <http://www.total.com> 2003.

UNFCCC: **The First Ten Years.** <http://www.unfccc.int/2004>.

Annexes

Annexe 1 - Préparation des gels

Préparation des gels et tampons utilisés pour les électrophorèses (produits Sigma, sauf indication contraire)

Quantités pour des gels réalisés avec le système mini protean II (Bio rad)

Gel de séparation (à 7,5% d'acrylamide):

Solution d'acrylamide/bisacrylamide à 40% (Bio-Rad)	:	1800 μL
TRIS-HCl pH 8,8	:	2500 μL
Eau distillée	:	5700 μL
SDS 20% p/v (si conditions dénaturantes)	:	50 μL
Persulfate d'ammonium 10% p/v	:	50 μL
TEMED	:	5 μL

Gel de concentration (à 4% d'acrylamide)

Solution d'acrylamide/bisacrylamide à 40% (Bio-Rad)	:	750 μL
TRIS-HCl pH 8,8	:	1500 μL
Eau distillée	:	3750 μL
SDS 20% p/v (si conditions dénaturantes)	:	30 μL
Persulfate d'ammonium 10% p/v	:	40 μL
TEMED	:	5 μL

Tampon de migration (0,7 L par cuve)

Trizma base (TRIS)	:	30,3 g
Glycine	:	144 g
SDS 20% p/v (si conditions dénaturantes)	:	10 g
Eau distillée	:	qsp 1 L

Ajustement du pH à 8,3 avant dilution

La solution est à diluer 10 fois avant d'être utilisée.

Tampon de chargement

Ce tampon est composé de TRIS 50 mM, glycine 284 mM, glycérol 20%, et de 0,001% Bleu de Bromophénol.

Annexe 2 - Coloration des protéines après migration électrophorétique

Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, le gel est placé dans une solution de fixation pendant 30 min, puis décoloré dans un bain d'acide acétique 10%, jusqu'à apparition des bandes. La composition de la

solution de fixation est la suivante :

Bleu de Coomassie	: 0,5 g
Ethanol 99,9%	: 225 mL
Acide acétique	: 50 mL
qsp 500 mL avec eau distillée	

Coloration au nitrate d'argent

Solution A (100 mL) :	Acide acétique : 12%
	Ethanol : 50%
	Eau MilliQ : qsp
	Formaldéhyde : 0,05% (ajouté extemporanément)

Solution B (200 mL) :	Ethanol 50% dans eau MilliQ
-----------------------	-----------------------------

Solution C (200 mL) :	Thiosulfate de sodium à 0,02% dans eau MilliQ.
-----------------------	--

Solution de nitrate d'argent (200 mL) :	Nitrate d'argent : 0,1% (p/v)
	Formaldéhyde : 150 μ L

Solution de carbonate (200 mL) :	Carbonate : 60 mg.L ⁻¹
	Formaldéhyde : 100 μ L

Solution de lavage (200 mL) :	Acide acétique : 12%
	Ethanol : 50%

- Le gel est placé dans la solution A pendant 45 min, sous agitation
- Le gel est rincé 15 min dans la solution B. Cette opération est répétée 3 fois.
- Le gel est ensuite placé 1 min dans la solution C, avant d'être incubé dans la solution de nitrate d'argent pendant 20 min.
- Le gel est finalement trempé dans la solution de carbonate jusqu'à ce que les bandes apparaissent.
- Afin d'éviter tout bruit de fond, il convient également de placer immédiatement le gel dans la solution de lavage.

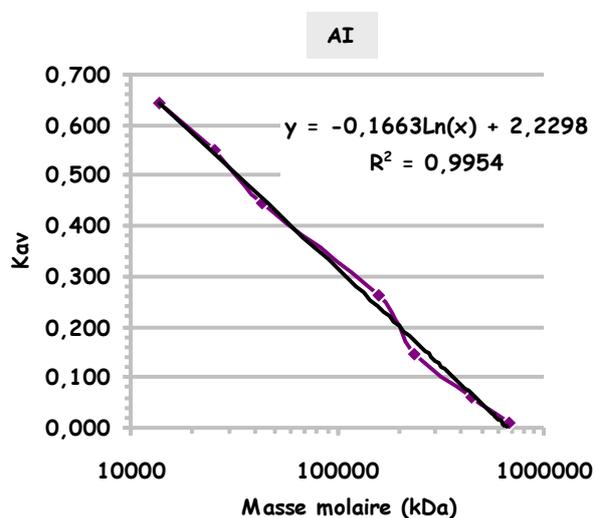
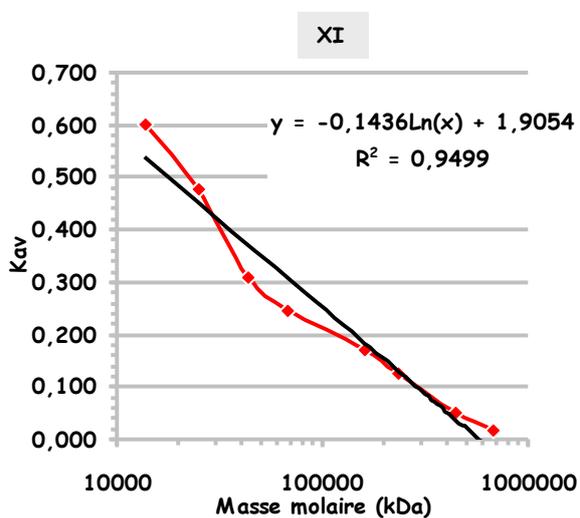
Coloration au 2,3,5-triphényltétrazolium (TTC)

- Le gel est placé dans la solution d'arabinose pendant 3 min, sous agitation
- Le gel est ensuite placé 1 min dans la solution NaOH 0,5N + TTC 0,25% dans le noir.
- Le gel est finalement trempé dans la solution d'acide hydrochlorhydrique 1N.

Annexe 3 - Courbe d'étalonnage et coefficients de partage des protéines de calibration de la colonne d'exclusion

Colonne utilisée : HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Amersham-Pharmacia™ Biotech)

Protéine	Masse Molaire (kda)	Ve (volume élution en mL)		Kav	
		XI	AI	XI	AI
Ribonucléase	13 700	230	240	0,602	0,646
Chymitrypsinogene	25 000	202	219	0,478	0,553
Ovalbumine	43 000	164	195,3	0,310	0,448
Albumine	67 000	150	150,4	0,248	0,249
Aldolase	15 8000	133	153,5	0,173	0,263
Catalase	232 000	123	127,5	0,128	0,148
Ferritine	440 000	106	108	0,053	0,061
Thyroglobuline	669 000	98,2	97,2	0,019	0,014



Annexe 4 - Séquençage L-arabinose isomérase

Mascot Search Results

Search title : E-PP-ECH-CC-2003(XIT)_62_0001-Spec.pkt
Database : NCBIInr 20060414 (3570920 sequences; 1227282874 residues)
Timestamp : 21 Apr 2006 at 10:31:39 GMT
Top Score : 81 for [gi|34812008](#), L-arabinose isomerase [Lactobacillus pentosus]

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 78 are significant ($p < 0.05$).

Concise Protein Summary Report

1. [gi|34812008](#) Mass: 53522 Score: **81** Expect: 0.028 Queries matched: 17
L-arabinose isomerase [Lactobacillus pentosus]
- [gi|28272705](#) Mass: 53539 Score: 48 Expect: 53 Queries matched: 13
L-arabinose isomerase [Lactobacillus plantarum WCFS1]
- [gi|10957376](#) Mass: 8653 Score: 31 Expect: 2.8e+03 Queries matched: 4
hypothetical protein [Salmonella typhi]
2. [gi|28272691](#) Mass: 23245 Score: 42 Expect: 2.5e+02 Queries matched: 6
transaldolase [Lactobacillus plantarum WCFS1]
3. [gi|28570282](#) Mass: 3257 Score: 41 Expect: 3e+02 Queries matched: 3
immunoglobulin heavy chain [Mus musculus]
4. [gi|71675607](#) Mass: 4136 Score: 39 Expect: 4.3e+02 Queries matched: 3
putative transposase [Trichodesmium erythraeum IMS101]
5. [gi|63029279](#) Mass: 15626 Score: 39 Expect: 4.9e+02 Queries matched: 5
CG3939 [Drosophila simulans]
6. [gi|73535325](#) Mass: 27059 Score: 37 Expect: 6.5e+02 Queries matched: 6
Chain B, Crystal Structure Of Estrogen Receptor Beta Complexed With Way-797
7. [gi|67909026](#) Mass: 16487 Score: 37 Expect: 6.8e+02 Queries matched: 5
hypothetical protein BproDRAFT_2540 [Polaromonas sp. JS666]
8. [gi|89207329](#) Mass: 3795 Score: 36 Expect: 1e+03 Queries matched: 3
conserved hypothetical protein [Bacillus weihenstephanensis KBAB4]

Search Parameters

Type of search : Peptide Mass Fingerprint
Enzyme : Trypsin
Variable modifications : Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
Mass values : Monoisotopic
Protein Mass : Unrestricted
Peptide Mass Tolerance : ± 25 ppm
Peptide Charge State : 1+
Max Missed Cleavages : 1
Number of queries : 63

Protein View

Match to: [gi|34812008](#) Score: **81** Expect: **0.028**
L-arabinose isomerase [Lactobacillus pentosus]

Nominal mass (M_r): **53522**; Calculated pI value: **5.04**

NCBI BLAST search of [gi|34812008](#) against nr

Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Lactobacillus pentosus](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Number of mass values searched: **63**

Number of mass values matched: **17**

Sequence Coverage: **35%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MLSVPDYEFW FVTGSQHLYG EEQLKSVAKD AQDIADKLNA SGKLPYKVVF
51 KDVMTTAESI TNFMKEVNYN DKVAGVITWM HTFSPAKNWI RGTLLQKPL
101 LHLATQYLNIPYADIDFDY MNLNQSAHGD **REYAYINARL QKHNKIVYGY**
151 **WGDEDVQEQI ARWEDVAVAY NESFKVKVAR FGDTRNVAV TEGDKVEAQI**
201 **KMGWTVDYIG IGDVVEEINK VSDADIDKEY ADLESRYEMV QGDNDADTYK**
251 HSVR**VQLAQY LGIKRFLER**G GYTAFTTNFE DLWGMEQLPG LASQLLIRDG
301 YGFGAEGDWK TAALGRVMKI MSHNK**QTAFM EDYTLDLRHG HEAILGSHML**
351 **EVDPSIASDK PRVEVHPLDI GKGADPARLV FTGSEGDAID VTVADFRDGF**
401 **KMISYAVDAN KPEAETPKLP VAKQLWTPKM GLKKGALWEM QAGGGHHTML**
451 SFSLTEEQME DYATMVG MNK AFLK

Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et Purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bif fermentans*.

Résumé : La production d'acide lactique à partir de ressources renouvelables telles que le son de blé comme alternative aux produits dérivés du pétrole présente un intérêt grandissant, notamment pour la production de polymère biodégradable d'acide lactique. Le son de blé est un co-produit composé d'hexoses et de pentoses et son utilisation comme substrat de faible coût dans diverses industries est envisagée. Cependant, peu de microorganismes consomment rapidement et efficacement les pentoses pour donner un seul et même produit. Dans le but de fermenter ces pentoses, un criblage a été réalisé et a permis d'isoler, une bactérie lactique *Lactobacillus bif fermentans* qui par la suite nous avons cherché à optimiser la production d'acide lactique de cette souche par des méthodes statistiques de surfaces de réponse, et cela, pour deux procédés de fermentation en réacteur batch : cellules libres et par inclusion des cellules sur calcium-alginate.

Dans un second temps, nous avons optimisé la production des activités xylose isomérase et arabinose isomérase de *Lactobacillus bif fermentans*. Ces enzymes présentent en effet un intérêt commercial important au niveau industriel pour la production de sirop de fructose et de tagatose. La xylose isomérase joue également un rôle dans la production d'éthanol à partir du xylose en fermentation simultanée avec des levures. Après amélioration des conditions de culture, ces enzymes ont été produites en fermenteur, purifiées et caractérisées. Finalement, *Lactobacillus bif fermentans* ne possède qu'une seule enzyme, l'arabinose isomérase, qui réalise ces deux activités et qui présente des similitudes avec l'arabinose isomérase de *Lactobacillus pentosus*.

Mots clés : Production, Acide lactique, Son de blé, Pentoses, Arabinose isomérase, *Lactobacillus bif fermentans*

Optimization of lactic acid fermentation process on wheat straw syrup and Purification and characterization of arabinose isomerase from *Lactobacillus bif fermentans*.

Abstract : Lactic acid production from renewable resources such as wheat straw as alternate to derived products from oil present a growing interest, in particular for the production of biodegradable polylactic acid polymer. The wheat straw is a by-product composed of hexoses and pentoses and its use as substrate of low cost in various industries is considered however, few microorganisms consume quickly and effectively pentoses to give a single product. Lactic acid bacteria were screened for pentoses fermentation and *Lactobacillus bif fermentans* showed the highest levels of lactic acid production. Thereafter we have optimized lactic acid production by this strain using response surface methodology, and that, for two fermentation process in batch bioreactor: free cells and by cells inclusion in calcium alginate.

In the second time, we describe the optimization of an appropriate fermentation medium for xylose isomerase and arabinose isomerase production by *Lactobacillus bif fermentans*. These enzymes have received increased attention by industries for their use in producing high fructose concentration syrup and tagatose. Xylose isomerase also presents potential application in the production of ethanol from xylose in simultaneous fermentation with yeasts. After improvement of the conditions of culture, these enzymes were produced out of bioreactor, purified and characterized. Finally, *Lactobacillus bif fermentans* has only one enzyme, L-arabinose isomerase, which carried out these two activities and which presents similarities with arabinose isomerase of *Lactobacillus pentosus*.

Keywords: Production, Lactic acid, Wheat bran, Pentose, Arabinose isomerase, *Lactobacillus bif fermentans*