

PRODUCTION DE BACTERIOCINE ISSUE DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* VB EN BIOREACTEUR

A. DOUMANDJI (1), A. HELLAL (2)

(1) - Université Saâd Dahleb, faculté agro-bio-vétérinaire, département agronomie, option sciences alimentaires, route de Soumaâ, BP 270 - 9000 Blida, Algérie.

(2) - Ecole Nationale Polytechnique, laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement, 16 rue des frères Ouadek, Hassen Badi 16200 Alger, Algérie.

RÉSUMÉ

Cette étude porte sur la production de bactériocine produite par *Lactobacillus acidophilus* VB isolée à partir de "Lben" de la région de Blida. Cette espèce représente une activité antimicrobienne à l'égard de *Lactobacillus bulgaricus* 340 (Danisco, Dangé-Saint-Romain).

Une fermentation a été réalisée à 37 °C. à pH contrôlé à 6,5. Quatre descripteurs sont déterminés : la consommation de la masse de la soude (m, en g), la vitesse de la consommation de la soude (dm/dt, en g/min), la conductivité (conduct, en mS) et la vitesse de la conductivité (dconduct/dt, en mS/min). Une fermentation à pH contrôlé à 6,5 semblerait favorable pour l'acidification et la production de la bactériocine.

Mots clés : *Lactobacillus acidophilus* VB, *Lactobacillus bulgaricus* 340, Bactériocine, Production, Fermenteur.

SUMMARY

This study relates to the production of bacteriocine produced by *Lactobacillus acidophilus* VB. This stock was isolated from a traditional Algerian dairy product "Lben". It produces a small bacteriocin, which was active against *Lactobacillus bulgaricus* 340. Fermentation was carried out at 37 °C. with pH controlled 6.5. Four descriptors are determined, consumption of the mass of soda (m, in g), the speed of the consumption of soda (dm/dt, in g/min), conductivity (conduct, in mS) and the speed of conductivity (dconduct/dt, in mS/min). A fermentation with pH controlled 6.5 would seem favourable for the acidification and the production of the bacteriocin.

Key words : *Lactobacillus acidophilus* VB, *Lactobacillus bulgaricus* 340, Bacteriocin, Production, Fermentor.

INTRODUCTION

Les bactéries lactiques sont utilisées dans de nombreux produits laitiers dont les laits fermentés, les fromages et les yaourts. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments ainsi qu'à la production de composés aromatiques. Les bactéries lactiques inhibent la prolifération de micro-organismes par la production de composés inhibiteurs telles les bactériocines (PIARD et DESMAZEAUD, 1991 et 1992) et en abaissant le pH par la production d'acide lactique (GILLILAND, 1985).

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, dont les vertus se ressemblent, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. Elles sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le tube digestif de l'homme. Si elles sont surtout connues pour le rôle qu'elles jouent dans la préparation des laitages fermentés, elles sont utilisées également dans le saumurage des légumes, en boulangerie, pour la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons. Les bactéries lactiques sont à l'origine de processus de transformation alimentaire. Ces micro-organismes sont présents dans différentes variétés d'aliments. Ces bactéries se composent principalement des genres *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* et *Carnobacterium* (BOYAVAI *et al.*, 1998 et ASLIM *et al.*, 2005).

Certaines souches de bactéries lactiques sont des probiotiques qui, une fois ingérées en quantité suffisante dans l'organisme, exercent des effets bénéfiques pour la santé allant au-delà des vertues nutritives de base (SCHAAFSMA, 1996). Ces bactéries ont le pouvoir de produire des composés antibactériens, des peptides dénommés bactériocines, douées d'une activité bactéricide à l'égard de plusieurs germes pathogènes (CENATEMPO *et al.*, 1996).

Les bactériocines de bactéries lactiques font l'objet d'une attention toute particulière depuis une dizaine d'années en raison de l'intérêt tant fondamental qu'appliqué qu'elles suscitent. Aujourd'hui, les probiotiques sont utilisés aussi dans un grand choix de laitages fermentés qui vont du kéfir (boisson liquide) jusqu'au yaourt (plus consistant).

Les bactériocines représentent un intérêt dans la conservation des denrées alimentaires par leur capacité à réguler la microflore existant dans les produits fermentés et inhibent la croissance des germes pathogènes. En agro-alimentaire seule la nisine issue de *Lactococcus lactis* est utilisée comme additif alimentaire afin d'inhiber la croissance des espèces nuisibles responsables des intoxications (DELVES-BROUGHTON, 1990). La nisine est efficace contre les germes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium tyrobutyricum* (CAI *et al.*, 1997).

Les ferments lactiques sont traditionnellement produits par fermentation discontinue appelée également fermentation "batch".

L'accumulation d'acide lactique non dissocié et le lactate, est un facteur important limitant la production de levains lactiques par cette technologie, les cultures en continu permettent d'éviter ce problème. Dans notre étude le lactosérum industriel déprotéiné enrichi en extrait de levure est utilisé comme substrat pour la production de bactériocine par *Lactobacillus acidophilus* VB en bioréacteur à pH régulé à 6,5.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel et milieu de culture du fermenteur

Le fermenteur utilisé est un réacteur Biolaflite (LSL-biolaflite-France) de 2,2 L (volume utile 1,8 L). Il est relié à un set de régulation permet-

tant de mesurer et de réguler le pH de culture. Le milieu de culture utilisé est de type industriel. Il s'agit d'un lactosérum doux en poudre, reconstitué à raison de 60 g/L. Afin d'insolubiliser les protéines de haut poids moléculaire, le pH est ajusté à 5,0 avec H_2SO_4 1N. Puis un traitement thermique est réalisé à 110 °C. pendant 20 minutes. Après refroidissement, le lactosérum est centrifugé à 10 000 g pendant 30 min. Le surnageant obtenu est filtré sur papier plissé de 4 à 7 μm de rétention puis complété avec de l'extrait de levure à raison de 20 g/L. L'extrait de levure permet d'enrichir le lactosérum en matières azotées. La stérilisation du milieu est ensuite effectuée dans le fermenteur avec la sonde du pH à 110 °C pendant 20 min (figure 1).



Figure 1 : Fermenteur de 2,2 L utilisé lors de la culture de *Lactobacillus acidophilus* VB

Conditions de culture

La préparation de l'inoculum de la fermentation est réalisé comme suit : une öse bien chargée de *L.b. acidophilus* VB estensemencée dans 5 mL de bouillon MRS puis incubée à 37 °C. pendant 24 h. Le matin de la fermentation, 100 μL sont repris dans 5 mL de bouillon MRS et incubé à 37 °C pendant 18 h.

Le fermenteur est muni d'un agitateur tournant à 200 rpm/min ; une sonde de conductivité électrique reliée à un transmetteur Mycom CLM 151 (Endress Hauser, Huningue, France) et une sonde de pH stérilisable (Ingold, Paris, France). Le pH est régulé par une introduction d'une solution de soude (NaOH 1N) à l'aide d'une pompe péristaltique commandée par un régulateur Demca type 3B101 (Promatex, Quinssaynes, France). La température de la fermentation est maintenue constante à 37 °C. par circulation d'eau chaude dans une double enveloppe. L'eau du bain Marie est portée à une température supérieure de 2 °C. à la température désirée.

Suivi de la fermentation

Deux mesures sont suivies au cours de la fermentation : la masse de la soude consommée et la conductivité. Le premier paramètre (mNaOH , en g) est mesuré sur une balance électrique. Les données sont enregistrées sur ordinateur en temps réel, grâce aux logiciels Wcunac-Indus et PPouf (INRA, grignon). Le deuxième paramètre (conduct, en mS) évolue en fonction de la concentration en lactate de sodium. 6 descripteurs sont mesurés :

- VmNaOH : vitesse maximale de consommation de soude (g/min).
- tmNaOH : temps pour atteindre VmNaOH (min).
- dNaOH : consommation de soude correspondant à VmNaOH (g).
- VmConduct : vitesse maximale de variation de conductivité (en mS/min).
- tmConduct : temps pour atteindre VmConduct (min).
- dConduct : variation de conductivité à VmConduct (mS).

Une fermentation à 37 °C à pH contrôlé 6,5 est réalisée. L'arrêt de la fermentation est déterminé à partir des courbes d'évolution des vitesses

de variation de la masse de NaOH et de la conductivité électrique. La fermentation est stoppée à ($t_{mNaOH} + 3$ h), c'est-à-dire après la fin de la phase exponentielle de croissance, et lorsque la vitesse de consommation de soude (V_{mNaOH}) et la vitesse de conductivité électrique ($V_{conduct}$) atteignent leurs valeurs maximales.

A la fin de la fermentation, un refroidissement du fermenteur est effectué à pH régulé, en plaçant le fermenteur dans un seau contenant de l'eau glacée pendant 30 min jusqu'à ce que la température du milieu descende à 15 °C. Le milieu fermenté est ensuite transféré stérilement dans des pots de centrifugation. Une centrifugation est ainsi réalisée à 10 000 g /30 min. Le surnageant brut actif est récupéré stérilement pour l'étude de l'activité de la bactériocine.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Suivi de la production de bactériocine en bioréacteur à pH régulé à 6,5

Une fermentation a été réalisée à 37 °C. à pH contrôlé 6,5, afin de déterminer les cinétiques de croissance et d'acidification de *Lb. acidophilus* VB. L'acidification est caractérisée par la quantité de soude consommée pour assurer la régulation du pH et par l'évolution de la conductivité électrique du milieu de culture. Les résultats de fermentation sont représentés au niveau des figures 2 et 3. Quatre descripteurs sont déterminés: la consommation de la masse de la soude (m , en g), la vitesse de la consommation de la soude (dm/dt , en g/min), la conductivité ($conduct$, en mS) et la vitesse de la conductivité ($dconduct/dt$, en mS/min).

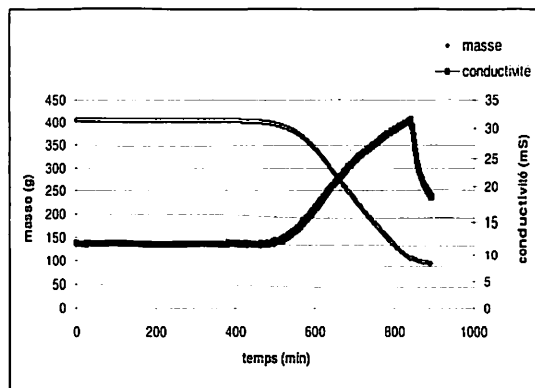


Figure 2 : Evolution de la masse et de la conductivité en fonction du temps.

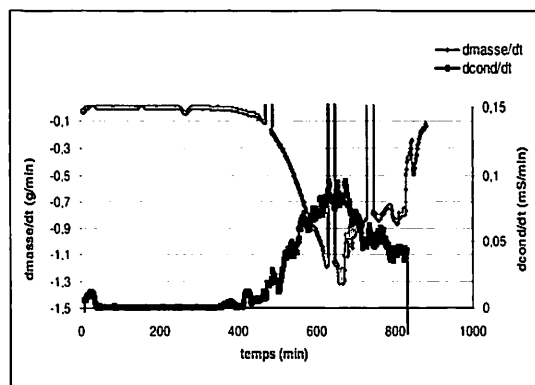


Figure 3 : Evolution de la vitesse de la consommation de masse de la soude et de conductivité en fonction du temps.

Après centrifugation réfrigérée de la culture à 10 000 g, les culots sont récupérés puis pesés afin de déterminer le poids de la biomasse. D'après nos résultats, la phase exponentielle de croissance débute après 427 minutes. de fermentation. Le temps nécessaire pour atteindre la vitesse maximale de fermentation est de 670 minutes. Après 5 minutes. d'inoculation du fermenteur, le nombre de *Lb. acidophilus* VB est de $5,00E+02$. Après 3 heures du temps nécessaire pour atteindre V_m , le nombre de *Lb. acidophilus* VB est

* Le tableau I représente le bilan de la fermentation à pH régulé à 6,5. Un dénombrement est effectué 5 minutes après inoculation du fermenteur (X_0) et à la fin de la fermentation (X_f).

Tableau I : Bilan de la fermentation à pH contrôlé 6,5.

Paramètres de fermentation	Fermentation pH 6,5
Début phase exponentielle (min)	427
Temps à Vm (min)	670
t (Vm + 3 h) (min)	850
Consommation maximale de soude (g)	143
Variation de conductivité maximale (mS)	11,74
Consommation finale de soude (g)	286
Variation de conductivité finale (mS)	21,04
(dm/dt)max (g/min)	-1,31
(dconduct/dt)max (mS/min)	0,095
Dénombrement X0 (nbr UFC/mL) après 5 min d'inoculation du fermenteur	5,00E+02
Dénombrement XF (nbr UFC/mL) à t (Vm + 3 h)	1,20E+09
Poids biomasse en g (dans 1,8 L)	21,6

optimal soit 1,20E+09. Le poids de la biomasse est de 21,6 g à partir de 1,8L de surnageant brut actif. Le test de l'activité antimicrobienne ainsi que le calcul des unités arbitraires de la bactériocine ont été déterminés à la fin de la fermentation. L'activité de la bactériocine dans le surnageant brut actif issu d'une fermentation à pH contrôlé 6,5 est de 25 600 UA/mL.

Nos résultats sont en accord avec la littérature qui indique que cette espèce présente un pH optimal de 6 pour l'acidification (GOMES et MALCATA, 1999) et la production de bactériocine (BOGOVIC-MATIJASIC et ROGELJ, 1998).

AVONTS *et al.*, (2004) ont suivie la cinétique de croissance, le métabolisme et la production de bactériocine issue de sept espèces probiotiques appartenant à la famille des lactobacilles sur deux milieux (bouillon MRS et lait) en bioréacteur à pH contrôlé à 6,5. Les probiotiques étudiés sont *Lactobacillus acidophilus* ACC, *L. acidophilus* IBB801, *L. casei* Imunitas, *L. casei* YIT 9029, *L. gasseri* K7, *L. johnsonii* Lal et *L. rhamnosus* GG. La production de bactériocine pour toutes les souches est meilleure dans le lait lorsqu'il est additionné d'extrait de levure. *L. acidophilus* IBB801 représente la meilleure

souche en cinétique de croissance (soit, 10,5 Log UFC/mL) et en production de bactériocine (soit, 3200 UA/mL).

MATARAGAS *et al.*, (2003) ont étudié l'influence du pH et de la température sur la croissance et la production de bactériocine par *Leuconostoc mesenteroides* L124 et *Lactobacillus curvatus* L442. Les conditions optimales de production des bactériocines n'ont pas coïncidé avec ceux de la croissance. Un pH compris entre 6,0 et 6,5 et une température de 30 °C. sont favorables pour l'optimisation de la croissance. Une optimisation de la production de bactériocine est obtenue lorsque le pH est de 5,5 et à 25 °C.

DELGADO *et al.*, (2005) ont étudié l'effet de la température et de la concentration en NaCl sur la production de bactériocine par *Lactobacillus pentosus* B96. La croissance de cette souche est meilleure à 30 °C., à pH neutre et en absence de NaCl. La température de 22 °C. et une concentration en NaCl de 0,65 mole/L stimulent la production de la bactériocine.

ZENDO *et al.*, (2005) ont constaté que la production de bactériocine issue d'*Enterococcus mundtii* diminue en absence de glucose, d'azote

ou de tween 80 dans le bouillon MRS. L'effet de l'addition de calcium sur la production de bactériocine a été étudié en ajoutant 0,04 mol/L de CaCO_3 ou de 0,1 mol/L de CaCl_2 dans le bouillon MRS. L'effet du pH sur la production de bactériocine a été suivi à pH contrôlé à 5,0, 6,0, et 7,0. Une production maximale de bactériocine est obtenue dans le milieu MRS par rapport à d'autres milieux (APT, M17, Elliker, bouillon de soja). Le meilleur milieu pour une optimisation de la croissance est le APT. La température optimale pour la production de bactériocine est à 25 °C. et 30 °C. dans le milieu MRS. L'influence des composants du MRS par l'addition de Ca^{+2} ou du Tween 80 sur la production et la croissance a montré que le taux de production étant très faible dans le MRS dépourvu de ces additifs.

CONCLUSION

La souche *Lactobacillus acidophilus* VB a été isolée à partir d'un produit laitier traditionnel algérien "Lben". Elle représente une activité antimicrobienne à l'égard d'une espèce lactique *Lactobacillus bulgaricus* 340. Un suivi de la croissance et de la production de bactériocine est réalisé en fermenteur à 37 °C. à pH contrôlé égal à 6,5. Ces conditions sembleraient favorables pour la production de biomasse et la production de bactériocine. A la fin de la fermentation, le nombre de *Lb. acidophilus* VB est optimal soit $1,20 \times 10^9$. Le poids de la biomasse a été déterminé. Il est de 21,6 g à partir de 1,8L de surnageant brut actif. L'activité de la bactériocine dans le surnageant brut actif issu d'une fermentation à pH contrôlé 6,5 est de 25 600 UA/mL.

Références bibliographiques

- ASLIM B., YUKSEKDAGA Z.N., SARIKAYAB E., BEYATLIA Y., 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT*, 38, 691-694.
- AVONTS L., VAN UYTVEN E., DE VUYST L., 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media, *International Dairy Journal*. 14, 947-955.
- BOGOVIC-MATIJASIC B., ROGELJ I., 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221, production studies in MRS-media at different pH-values and affect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Processes in Biochemistry*, 33, 345-352.
- BOYAVAL P., BHUGALOO-VIAL P., DUFFES F., MERIVIER A., DOUSSET X, MARRION D., 1998. Réacteurs à haute densité cellulaire par production de solution concentrée de bactériocine. *Lait*, 78, 129-133.
- CAI Y., NIG L. K., FARBER J. M., 1997. Isolation and characterization of nisine producing by *Lactococcus lactis* sbsp *lactis* from bean-sprouts. *J. Appl. Microbiol.*, 83, 499-507.
- CENATIEMPO Y., BERJEAUD J.M. BIET F., FREMAUX C., HECHARD Y., ROBICHAN D., 1996. Bactériocines des bactéries lactiques: Données récentes sur leur structure, leur mode d'action et leur déterminant génétique. *Lait*, 76, 169-177.
- DELGADO A., BRITO D., PERES C., NOÉ-ARROYO F., GARRIDO-FERNANDEZ A., 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, 22, 521-528.

- DELVES-BROUGHTON J., 1990. Nisine and its applications as a food preservation, J. Soc. Dairy Technol., 43, 73-76.
- GILLILAND S.E., 1985. Bacterial Starter Cultures for Foods. Boca Raton, Florida : CRC Press. 175-185.
- GOMES A.M.P., MALCATA F.X., 1999. Bifidobacterium spp and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in food science and technology, 10, 139-157.
- MATARAGAS M., METAXOPOULOS J., GALIOTOU M., DROSINOS E.H., 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science, 64, 265-271.
- PIARD J.C., DESMAZEAUD M.J., 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Le lait, 71, 5, 525-541.
- PIARD J.C., DESMAZEAUD M.J., 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria, bacteriocins and other antibacterial substances. Le lait, 72, 2, 113-142.
- SCHAAFSMA G., 1996. State of the art concerning probiotic strains in milk products. Int. Dairy Fed. Nutr. Newsl, 5, 23-24.
- ZENDO T., EUNGRUTTANAGORN N., FUJIOKA S., TASHIRO Y., NOMURA K., SERA Y., KOBAYASHI G. NAKAYAMA J., ISHIZAKI A., SONOMOTO K., 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. Journal of Applied Microbiology, 99, 1181-1190.