

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 80 22401

(54) Procédé de culture de microorganismes, en particulier de levures, sur du lactosérum avec une association de souches judicieusement choisies et des mutants spécifiques d'une souche.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 N 1/00; A 23 J 1/18.

(22) Date de dépôt..... 20 octobre 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 16 du 23-4-1982.

(71) Déposant : Société dite : FROMAGERIES BEL, société anonyme, résidant en France.

(72) Invention de : Bernard Malige, Raymond Goudal, Guy Moulin et Pierre Galzy.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Novapat - cabinet Chereau
107, bd Pereire, 75017 Paris.

- 1 -

La présente invention se rapporte à l'industrie alimentaire et, plus spécifiquement, à un procédé d'optimisation de cultures de microorganismes, notamment de levures, spécialement de levures lactiques, pour la production de biomasse ou 5 de métabolites intermédiaires de fermentation, utilisables dans l'industrie alimentaire.

Un des procédés connus de culture de levures lactiques sur du lactosérum est décrit dans le brevet français n° 1.128.063 de la société dite Fromageries Bel. Il se rapporte 10 à un procédé de fabrication de levures lactiques éclatées, qui consiste à séparer par précipitation les corps fermentescibles azotés, protéines et albumines, contenus dans le sérum de fromagerie ou de caséinerie ou dans le mélange sérum-babeurre, et à absorber et transformer par des levures les corps hydrocarbo- 15 nés existant dans le sérum ou le mélange ainsi déprotéiné. La fermentation, menée dans des conditions de pH, d'aération et de températures précises, est effectuée par des souches de Saccharomyces, classées ultérieurement dans l'espèce Kluyveromyces (Lodder, 1970).

20 Depuis la date de dépôt (22 juin 1955) du brevet français n° 1.128.063, ce procédé a fait l'objet de nombreuses améliorations, notamment en ce qui concerne l'adaptation des cultures aux nouvelles techniques de déprotéination du lactosérum, ainsi que le conditionnement et la conservation des cellules de levures obtenues. La déprotéination du lactose, autrefois 25 effectuée par précipitation thermique, est maintenant réalisée par ultrafiltration et chromatographie échangeuse d'ions. De plus, le

substrat carboné, autrefois constitué de lactose, est maintenant formé de lactose hydrolysé, tel que cela est indiqué dans la demande de brevet français n° 78/30229 déposée par la société dite des Fromageries Bel, où l'on conduit la culture 5 d'un microorganisme sur le substrat laitier renfermant du lactose hydrolysé.

Actuellement, la production de levure-aliment est basée sur la culture préférentielle de certaines souches sur certains milieux : par exemple, le Kluyveromyces fragilis est 10 cultivé sur du lactosérum, le Candida lipolytica sur des alcanes, le Candida tropicalis sur du gaz-oil et le Candida utilis sur des mélasses.

Ces fermentations, conduites le plus souvent dans des conditions de non-stérilité, entraînent la présence, dans 15 le mélange, d'autres espèces qui, le plus souvent, ne sont pas souhaitées. De ce fait, un inconvénient résultant est que la souche souhaitée peut être amenée à être éliminée du fermenteur par une souche "pirate contaminante".

De plus, si l'on veut obtenir le développement d'une 20 culture pure, il faut que le substrat carboné de croissance soit de qualité stérile constante pour maintenir une souche unique de fermentation. Or, les lactosérum provenant de la fabrication de fromages à caillé lactique ou de caséine lactique (lactosérum acides) contiennent 4 à 10 g/l d'acide lactique, alors 25 que les lactosérum provenant de la fabrication de fromages à caillé présure ou de caséines-présure (lactosérum doux) ne contiennent que 1 à 3 g/l d'acide lactique. De plus, la variation de la teneur en acide lactique du substrat est due également au fait que les unités industrielles de traitement du lactosérum reçoivent cette matière à traiter continuellement tout 30 le long de la journée et, en fonction de son origine, ce lactosérum a un rapport lactose/acide lactique qui varie tout le long de celle-ci.

Pour répondre à la variation de ce rapport, il est nécessaire de 35 concevoir un système susceptible de s'adapter à ces variations par une sélection de souches présentant une spécificité d'assimilation des substrats. Une telle spécificité, compte tenu des phénomènes de diauxie existant en culture continue, n'est envisageable que par la sélection de mutants qui au-

ront perdu la capacité d'assimiler l'un ou l'autre des substrats carbonés présents. On entend par diauxie, la capacité d'adaptation d'une souche à la consommation de différents substrats l'un après l'autre, ce qui impose le choix entre des vitesses de 5 croissance limitée de façon à consommer toutes les sources de carbone ou des vitesses de croissance rapide et une perte de substances carbonées.

L'augmentation de la vitesse de croissance d'une culture dans laquelle il y a spécificité de consommation d'une 10 espèce vis-à-vis d'un substrat se traduit en fait par la saturation du métabolisme oxydatif des Kluyveromyces et une partie de la source de carbone est dégradée par voie fermentaire, ce qui conduit à l'apparition obligatoire d'éthanol. Cet éthanol est connu comme étant un métabolite toxique pour les 15 cellules ; de ce fait, sa présence entraîne une inhibition de la croissance des levures. On se trouve dès lors limité par la concentration de ce métabolite dans ce milieu. Il est donc indispensable, pour imposer des vitesses de croissance maxima, d'éliminer ce métabolite ; or, il représente une potentialité 20 de synthèse. Une façon judicieuse de profiter de cette potentialité est d'introduire une souche capable d'assimiler ce substrat et ce de façon spécifique.

Il serait donc utile de remédier aux inconvénients du procédé habituel et d'apporter une solution aux problèmes 25 décrits ci-dessus. La présente invention a pour but de permettre l'optimisation des conditions de culture sur un substrat lactique, en se basant sur les techniques de culture actuellement connues et, notamment, sur l'opportunité d'avoir des cultures mixtes, tel que cela est décrit dans un article de 30 Harrisson P.E. intitulé : "Cultures mixtes dans les procédés de fermentation industrielle" (Advances in Applied Microbiology (1978), 24, p.129-164) qui donne un exemple de cultures mixtes sur du méthane et du méthanol. L'emploi des cultures mixtes permet une augmentation des performances par utilisa- 35 tion des différents substrats.

Un objet de la présente invention est de prévoir un procédé de culture avec association de souches, dont cha-

cune utilisera un constituant différent du milieu, et ceci de façon exclusive, ce qui fournit une absence de compétition vis-à-vis des différents autres substrats du milieu.

Un autre objet de la présente invention est de 5 sélectionner des mutants spécifiques d'une souche pour un substrat afin de créer des "niches" écologiques, chaque "niche" correspondant à une association de souches appartenant à la même espèce, souches qui seront dépendantes du développement global de la culture, donc des "niches" voisines.

10 D'autres objets apparaîtront d'après la description suivante.

Ces objets sont maintenant atteints par un procédé de culture de microorganismes, en particulier de levures, sur du lactosérum en tant que substrat de départ, procédé dans 15 lequel, après séparation des protéines contenues dans le lactosérum et récupération des autres constituants, on réalise la culture sur le substrat lactique ainsi obtenu en utilisant, d'une part, une association de souches judicieusement choisies, dont chacune se développe d'une façon spécifique sur un substrat 20 donné présent naturellement dans le milieu ou sur les métabolites formés au cours du processus de fermentation et, d'autre part, des mutants spécifiques d'une souche afin de créer des "niches" écologiques correspondant à une association de souches appartenant à la même espèce.

25 Dans la présente invention, les milieux de culture sont des lactosérum provenant de différents traitements laitiers et fromagers, c'est-à-dire des lactosérum doux ou acides, partiellement ou totalement déprotéinés par différents procédés connus et utilisables industriellement (précipitation par traitement thermique, séparation par ultrafiltration, chromatographie d'exclusion et d'échange d'ions, etc.) et partiellement ou totalement hydrolysés par voix enzymatique (traitement avec une β -galactosidase) ou chimique.

Quel que soit le milieu de culture d'origine, 35 il se compose toujours, d'une part, de lactose (ou d'un mélange de glucose, de galactose et de lactose dans le cas d'un lactose hydrolysé) et, d'autre part, d'acide lactique et d'autres acides

organiques. La proportion de ces deux catégories de substrats peut varier selon l'origine et la technologie d'obtention du milieu.

Dans le procédé de la présente invention, on sélectionne judicieusement plusieurs souches à hautes performances en ce qui concerne leur taux de croissance ou le rendement de leur composition en protéines et leur spécificité à croître sur un substrat, et on les associe en vue de les cultiver sur chacun des substrats carbonés présents même en faible quantité dans la matière naturelle de départ ou sur les métabolites formés au cours du processus de fermentation. Au bout d'un certain temps, il résulte un équilibre de flore très stable, la proportion des différentes espèces dépendant de la concentration des substrats les uns par rapport aux autres.

Pour fonctionner de manière optimale, un tel système nécessite des "niches" écologiques. A l'intérieur de chacune d'entre elles, il existe une compétition entre les différentes souches susceptibles de croître avec les vitesses variables sur le seul substrat présent. Il est évident que les sélections à l'intérieur de chacune des "niches" sont dépendantes, en particulier pour la niche "éthanol", dont la concentration en substrat dépend de l'activité fermentaire des souches appartenant aux deux autres "niches" (lactose et ses dérivés d'hydrolyse acide lactique et autres acides organiques) et, en particulier, à la niche "lactose".

Les souches sélectionnées appartiennent notamment aux espèces suivantes : Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis et Torulopsis bovina. Les Kluyveromyces fragilis se développent sur du lactose, les Kluyveromyces lactis sur l'acide lactique, sans possibilité d'interférences, et les Torulopsis bovina sur l'éthanol. L'équilibre entre les souches varie selon la proportion des substrats dans le milieu et de la capacité du fermenteur pour la quantité d'éthanol produite.

A titre d'exemple, on peut donner la répartition suivante dans un milieu composé de lactose, d'acide lactique et d'éthanol comprenant 90-95 % de lactosérum, 5-10 % d'acide lactique et 1-3 % d'éthanol :

- Kluyveromyces fragilis environ 90 à 95 %
- Kluyveromyces lactis environ 5 à 10 %
- Torulopsis bovina environ 1 à 3 %

Si le milieu est du lactosérum partiellement ou totalement hydrolysé, ce qui entraîne la présence de deux substrats carbonés supplémentaires, le glucose et le galactose, il peut être intéressant d'utiliser une nouvelle souche de levures tel-
 5 le que Saccharomyces cerevisiae ou Candida utilis. On doit noter que le taux d'hydrolyse du lactose peut varier entre 0 et 100 %, la répartition du glucose et du galactose entre 0 et 45 % et celle du lactose entre 0 et 95 %.

L'équilibre des souches, qui varie en fonction de la
 10 nature des substrats, est le suivant, lorsqu'il y a hydrolyse du lactose à 80-90 % et que les substrats sont constitués de 10-20 % de lactose, de 36-43 % de glucose, de 36-43 % de galactose, de 5-10 % d'acide lactique et de 1-3 % d'éthanol:

- Kluyveromyces fragilis environ 45 à 65 %
- Kluyveromyces lactis environ 5 à 10 %
- Candida utilis environ 35 à 45 %
- Torulopsis bovina environ 1 à 3 %

Les fermenteurs employés travaillent, dans des conditions optima, à des températures comprises entre environ 30 et 40°C, à un pH d'environ 3 à 4, avec un débit d'arrivée d'air égal à environ 1800 m³/h, avec une gamme d'environ 2 à 3 milliards de cellules totales par cm³, cette gamme étant la même quelle que soit la souche. On doit remarquer que, le volume d'air étant toujours fonction du volume du milieu, celui de 25 m³ correspond à un volume du milieu de 1800 m³/h. En exprimant le volume d'air non pas en m³/h mais en VVm (volume d'air/volume du milieu/mn), les conditions optima se situent entre 1,2 et 1,5. Comme on travaille en continu, le débit est constant pendant la fermentation et avant le soutirage.

Le rendement en biomasse et/ou en métabolites peut être augmenté en incorporant dans le milieu de culture des substances minérales, telles que le phosphore, le cuivre, le zinc, le fer et divers autres éléments qui sont des substances nutritives pour les microorganismes (addition de H₃PO₄, CuSO₄, ZnSO₄, FeSO₄).

Par rapport aux procédés de culture existant actuellement, à une seule souche primordiale et à souches secondaires parasites, le procédé de la présente invention a les avantages

suivants :

1°) Il est possible d'adapter le procédé aux différents rapports lactose/acide lactique existant dans les lactosérum, qui sont les milieux naturels de culture.

5 2°) On utilise la totalité de chaque source de carbone avec limitation des pertes, d'où l'obtention d'un rendement optimum, qui est d'environ 50 à 55 %. En l'absence de souche métabolissant l'éthanol, la perte serait au moins égale à la proportion de Torulopsis bovina, soit 2 à 3 %.

10 3°) Il est possible de travailler avec des vitesses maxima de croissance des souches principales, du fait de la consommation par une tierce souche de métabolite intermédiaire toxique, d'où l'obtention d'une productivité maxima de l'ensemble du dispositif (fermenteur); le gain de productivité est environ 15 à 20 % par rapport au procédé normal à une seule souche primordiale.

15 4°) On supprime la compétitivité "interniches", tout en maintenant, d'une part, la compétitivité à l'intérieur de chaque niche et, d'autre part, la compétitivité des souches entre les niches.

20 5°) Les installations ne sont pas sophistiquées en ce qui concerne l'aération et la limitation des transferts air-liquide qui constituent habituellement le facteur limitant ces installations.

25 6°) La conduite des opérations est simplifiée.

Le procédé de la présente invention permet la production de biomasse (levure-aliment) et/ou de métabolites intermédiaires.

30 La présente invention sera maintenant décrite à l'aide des exemples suivants qui ne sont donnés qu'à titre d'illustration et non pas de limitation de la présente invention.

EXEMPLE 1

On part d'un lactosérum doux provenant d'une fromagerie, que l'on déprotéine par ultrafiltration.

35 Ce lactosérum déprotéiné est envoyé dans un fermenteur dit Airlift, travaillant dans les conditions suivantes :

- 5

 - volume utile : 23 m^3
 - débit : 7600 l/h
 - pH : $3 \text{ à } 4$
 - température : $30 \text{ à } 40^\circ\text{C}$
 - débit d'air : $1800 \text{ m}^3/\text{h}$
 - addition d'une source azotée : $\text{NH}_4 \text{ OH}$

Les souches sélectionnées sont les suivantes, avec l'équilibre indiqué ci-dessous :

Des contrôles systématiques sur deux ans de la flore présente dans le milieu ont montré une répartition très stable entre les espèces.

EXEMPLE 2

On part d'un lactosérum acide provenant d'une caséinerie, que l'on a déprotéiné par ultrafiltration et dont on a hydrolysé partiellement (à 90 %) le lactose à l'aide d'une β -galactosidase.

La fermentation se fait selon les mêmes conditions que celles données dans l'exemple 1.

Les souches sélectionnées sont les suivantes :

- 25

 - Kluyveromyces fragilis sur lactose et galactose
 - Kluyveromyces lactis sur acide lactique
 - Candida utilis sur glucose
 - Torulopsis bovina sur éthanol

La répartition des souches est la suivante :

- 30 - Kluyveromyces fragilis : 49,5-58,5 %
 - Kluyveromyces lactis : 5-10 %
 - Candida utilis : 40 - 43 %
 - Torulopsis bovina : 1 - 3 %

35 Des contrôles systématiques sur deux ans de la flore présente dans le milieu ont montré une répartition très stable entre les espèces.

- 9 -

La présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation qui viennent d'être décrits, elle est au contraire susceptible de variantes et de modifications qui apparaîtront à l'homme de l'art.

REVENDICATIONS

1 - Procédé de culture de microorganismes, en particulier de levures, sur du lactosérum en tant que substrat de départ, caractérisé en ce qu'après séparation des protéines 5 contenues dans le lactosérum et récupération des autres constituants, on réalise la culture sur le substrat lactique ainsi obtenu, en utilisant, d'une part, une association de souches, dont chacune se développe d'une façon spécifique sur un substrat donné présent naturellement dans le milieu, ou sur les métabolites formés au cours du processus de fermentation, et, d'autre part, des mutants spécifiques d'une souche afin de créer des "niches" écologiques correspondant à une association de souches appartenant à la même espèce.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé 15 en ce que l'association de souches est constituée de Kluyveromyces fragilis, se développant sur du lactose, de Kluyveromyces lactis, se développant sur de l'acide lactique, de Candida utilis et de Saccharomyces cerevisiae, se développant sur du glucose, et de Torulopsis bovina se développant sur de l'éthanol.

20 3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le substrat de départ est un lactosérum doux ou acide provenant de divers traitements laitiers et fromagers.

4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé 25 en ce que le substrat de départ est partiellement ou totalement déprotéiné par précipitation à l'aide d'un traitement thermique ou acide, par séparation par ultrafiltration ou chromatographie d'exclusion et d'échange d'ions.

5 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé 30 en ce que le substrat de départ est également partiellement ou totalement hydrolysé par voie enzymatique ou chimique.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que, quelle que soit son origine, le milieu de culture est composé d'un mélange de deux (ou davantage) substrats choisis dans le groupe se composant de lactose, d'acide lactique, d'éthanol et, éventuellement, de galactose et de glucose.

7 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé

en ce qu'à l'intérieur de chacune des "niches", on maintient une compétition entre les différentes souches susceptibles de croître avec le meilleur rendement sur le seul substrat présent.

5 8 - Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que les souches sélectionnées appartiennent aux espèces Kluyveromyces fragilis, Kluyveromyces lactis, Torulopsis bovina, Saccharomyces cerevisiae ou Candida utilis.

9 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les souches sélectionnées sont des microorganismes qui ont l'aptitude à croître sur le ou les substrats, présents dans le milieu, qui se forment au cours du processus de fermentation.