

Valorisation du Lactosérum par la Production de Levures Lactiques avec les Procédés de Fermentation Discontinue et Continue

S. Gana¹ et A. Touzi²

¹ Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Boumerdès, Avenue de l'Indépendance, 35000 Boumerdès

² Laboratoire de Biomasse, Centre de Développement des Energies Renouvelables, B.P. 62, Route de l'Observatoire, Bouzaréah, Alger

Résumé – L'industrie agro alimentaire doit faire face à un problème devenu au fil de ces dernières années de plus en plus crucial. Il s'agit de la pollution créée par les déchets et les rejets de cette industrie. L'industrie laitière en est une de l'activité agro-alimentaire. En effet, à l'origine de la production de grandes quantités de lactosérum. Pour remédier à ce problème, de nombreux procédés sont envisageables. Parmi ceux-ci, on distingue la production d'Organismes Unicellulaires 'POU'. En effet, les besoins en protéines nobles ont considérablement augmenté. Ceci est due à leur richesse en facteurs de croissance. Ainsi, la recherche de nouvelles sources de protéines non conventionnelles, comme les Protéines d'Organismes Unicellulaires 'POU' s'impose. Ce travail de recherche s'axe sur la production de biomasse 'POU' sur lactosérum. La première partie de cette étude est consacrée à la sélection de levures locales ayant une bonne croissance sur lactosérum déprotéiné. L'identification, l'optimisation des conditions physico-chimiques (T, pH, agitation) et l'étude de la cinétique de croissance ont montré que la souche *Kluyveromyces fragilis* présente un rendement élevé. La deuxième partie a porté sur la conduite des essais de fermentation en discontinu et continu dans des fermenteurs de 2 litres et de 5 litres. Les résultats ont montré qu'en culture continue, des taux de dilution inférieurs à 0,2 h⁻¹ permettent d'obtenir une dépollution maximale (DCO_z≅0), une productivité élevée de l'ordre de 2,44 g/l/h et un rendement en biomasse de 61 %.

Abstract – The aim of this study was an selection of local yeasts for production feed yeast or a single cell protein on cheese whey. A culture of these yeasts on synthetical medium contains only lactose, was showed a best ability and performance of *Kluyveromyces fragilis* to use lactose and to convert it to biomass. Continuous and batch cultures of *Kluyveromyces fragilis* on cheese whey have been optimized to obtain the highest conversion yield of lactose into biomass, more pollution reduction of cheese whey through yeast *Kluyveromyces fragilis* was obtained.

Mots Clés: *Kluyveromyces fragilis* - Biomasse - Fromage – Culture discontinue – Culture continue.

1. INTRODUCTION

De nombreux sous-produits de l'industrie alimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution de part leur grande quantité. Parmi ceux-ci, nous sommes intéressés à l'industrie laitière, l'unité O.R.L.A.C de Boudouaou qui pour la production fromagère rejette quotidiennement 6000 litres/jour de lactosérum, soit pour chaque kilogramme de fromage produit, un résidu de 4 à 12 kg de lactosérum est rejeté. Par sa composition biochimique (lactose, protéines, vitamines, ...), le lactosérum est un excellent milieu de culture pour les micro-organismes et devient un facteur de pollution redoutable [1]. Pour valoriser ces tonnages élevés de lactosérum, la production de levures ou protéines d'organismes unicellulaires par fermentation constitue une des voies les plus attractives.

Plusieurs études ont été consacrées à la recherche de nouvelles souches de levures plus performantes pour transformer le lactose, principal sucre présent dans le lactosérum en biomasse [2, 6, 7, 9, 11, 12]. Les levures à utiliser pour la transformation du lactose doivent satisfaire les critères suivants : transformer complètement et rapidement le lactose en biomasse par voie aérobie afin d'obtenir un rendement élevé.

L'objectif de cette étude est de sélectionner des souches de levures capables de convertir le lactose en biomasse avec de meilleurs rendements en culture discontinue et continue et d'arriver à une meilleure épuration de l'effluent et par conséquent de réduire potentiellement la pollution provoquée par le rejet du lactosérum dans les eaux résiduaires.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Micro-organismes

L'étude a été réalisée sur des souches de levures isolées et identifiées à partir de produits laitiers commercialisés [7]. Il s'agit de *Candida kefir1* (Ck1), *Candida kefir2* (Ck2), *Kluyveromyces fragilis* (Kf), *Kluyveromyces lactis1* (Kl1), *Kluyveromyces lactis2* (Kl2) et *Kluyveromyces lactis3* (Kl3) isolées respectivement du lait pasteurisé, du yaourt, du lactosérum doux et du fromage à pâte molle.

2.2 Milieux de culture

Dans un premier temps, le milieu choisi pour la préculture et la culture des levures est le milieu Y.P.S.L. Ce milieu contient comme source de carbone, le lactose à raison de 2 %, de l'extrait de levure à 0,1 % et 2 % de peptone. En second lieu, nous avons utilisé un milieu à base de lactosérum doux, provenant de l'unité O.R.L.A.C de Boudouaou. Ce dernier subit une déprotéinisation par chauffage. Ajusté à 20 g/l de lactose, il est ensuite conditionné pour être complété en facteurs nutritionnels avec 3 g/l de sulfate d'ammonium [6]. Les facteurs de croissance (acides aminés et vitamines) sont ajoutés sous forme d'extrait de levure à raison de 1 g/l. Une solution d'oligoéléments est ajoutée au milieu à raison de 1 ml/litre de milieu de culture. La composition de cette solution minérale est la suivante en (g/l) : 0,3 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 4,0 $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,8 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,4 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 3,0 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

2.3 Conduite des fermentations

La préparation de l'inoculum se fait par des précultures en fioles d'erlenmeyers, la conduite des fermentations discontinues sont conduites un réacteur Biolafitte de 2 litres. Le volume utile est de 1,2 litres. Le pH est régulé à 4,5 par ajout de NaOH 2N, la température est maintenue à 30 °C, l'aération est assurée par un débit d'air filtré de 1 v.v.m, l'agitation est de 720 tr/mn. Les cultures continues ont été réalisées à différents taux de dilution. Concernant les cultures discontinues réalisées en réacteur de 5 litres, nous avons retenu les mêmes conditions de culture, le volume utile de 3 litres, l'aération est assurée par un débit d'air filtré de 1,6 v.v.m.

2.4 Techniques analytiques

La biomasse est évaluée en centrifugeant 10 ml de la culture à 3200 tr/mn, pendant 15 minutes. Après lavage à l'eau distillée, le culot est récupéré dans une capsule en acier inoxydable préalablement tarée, puis séché à 105 °C pendant 24 heures. La mesure de densité optique à 660 nm a été utilisée pour suivre l'évolution des cultures continues, sachant qu'elle est proportionnelle à la DO. Les sucres résiduels sont dosés par la méthode calorimétrique au phénolsulfurique [3]. L'éthanol est dosé par chromatographie en phase gazeuse, le chromatographe est équipé d'une colonne en nickel remplie de Porapak Q 80. Le gaz vecteur est l'azote. La température du four est de 180 °C, celle de l'injecteur et du détecteur (FID) est de 220 °C. Sachant que la demande chimique en oxygène (DCO)est la mesure de l'oxygène (mg/l) équivalent à la quantité de matières organiques oxydables par le bichromate de potassium, elle est déterminée selon la méthode ISO 6060.

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3.1 Culture et sélection de souches de levures performantes pour la production de biomasse

La croissance des levures isolées a été testée sur un milieu YPLS. Les résultats obtenus dans le tableau 1 indique une très bonne croissance de *Kluyveromyces fragilis*, sur ce milieu, la phase de latence dure seulement deux heures. La biomasse produite est de 11 g/l (Fig. 1), la totalité du lactose est consommée au bout de 10 heures (Fig. 2), le taux de croissance atteint $0,35 \text{ h}^{-1}$, ainsi, le rendement final est égal à 55 %. Selon les travaux de plusieurs auteurs [2, 6, 9, 12], cette levure se présente comme le micro-organisme le plus adapté à la production de biomasse.

Les espèces *Candida kefyr1* et *Candida kefyr2* se développent moins rapidement sous les conditions opératoires choisies. En effet, *Candida kefyr1* métabolise la totalité du lactose qu'après 42 heures de culture. Un temps relativement long pour une éventuelle utilisation future de cette souche pour la production de biomasse. Par ailleurs, *Candida kefyr2* le taux de croissance atteint $0,27 \text{ h}^{-1}$ seulement, le lactose n'est pas métabolisé en entier. Quant à *Kluyveromyces marxianus*, la croissance est très lente sur ce milieu et sous ces conditions de culture, un taux de croissance faible égal à $0,06 \text{ h}^{-1}$, le lactose est faiblement assimilé (13 %). Donc, on peut dire que *Candida kefyr1*, *Candida kefyr2* et *K. marxianus* ne sont pas adaptées à se développer sur un milieu riche en lactose comme le lactosérum.

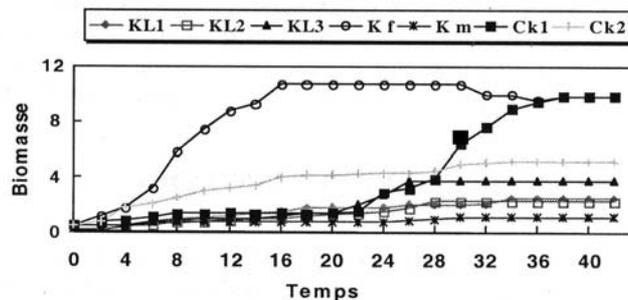


Fig. 1: Culture des levures isolées sur milieu YPSL
Variation de la biomasse (g/l) en fonction du temps

Tableau 1: Résultats des paramètres de la cinétique de croissance des levures étudiées sur milieu YPSL

Souches de Levures étudiées	Temps de latence (h)	Biomasse finale (g/l)	Lactose utilisé (%)	Rendement en biomasse (%)	Taux de croissance (h^{-1})
<i>Kluyveromyces Lactis1</i> (K11)	16	2,5	47	23	0,07
<i>Kluyveromyces Lactis2</i> (K12)	26	2,3	43	20	0,08
<i>Kluyveromyces Lactis3</i> (K13)	20	3,75	49	37	0,09
<i>Candida kefyri1</i> (Ck1)	22	10	100	49,5	0,28
<i>Candida kefyri2</i> (Ck2)	02	5	57,5	45	0,27
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (Kf)	02	11	100	55	0,35
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (Km)	28	10	13,5	6	0,06

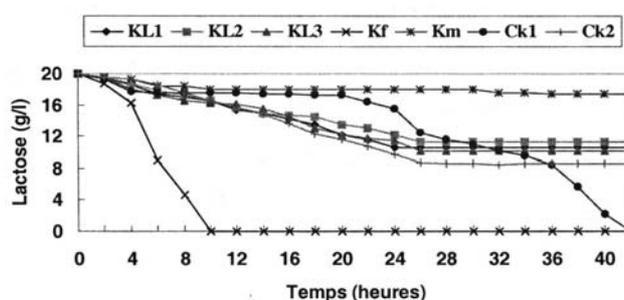


Fig. 2: Culture sur milieu YPSL des levures
Variation de la concentration du lactose (g/l) en fonction du temps

Par ailleurs, les levures du genre *Kluyveromyces lactis* présentent une cinétique de croissance différente des levures citées préalablement (Fig. 1). Le développement de ces levures paraît très long sous ces conditions. Le taux de croissance varie entre 0,07 et 0,09 h^{-1} . La biomasse produite par ces trois espèces est très faible. Le maximum atteint est de 3,75 g/l seulement produit par *Kluyveromyces lactis1*. Toutefois, le lactose est faiblement assimilé par ses levures (Fig. 2). D'après [1], ces levures sont exigeantes pour certains facteurs nutritionnels tel que l'acide lactique.

D'après les travaux de Fiedurek- et al. [4] sur la sélection de souches de levures, ayant une aptitude à dégrader le lactose comme seule source de carbone, il a été démontré que leur capacité à métaboliser le lactose est liée à l'activité de la β galactosidase (l'enzyme qui scinde le lactose en glucose et galactose) et de ce fait, cette activité enzymatique est directement liée aux conditions physico-chimiques du milieu de culture.

3.2 Culture discontinue de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi en bioréacteur de 2 l

Nous avons constaté, donc que *Kluyveromyces fragilis* possédait des capacités importantes à transformer le lactose en biomasse, c'est pourquoi, nous l'avons utilisé pour la suite de nos expérimentations. Afin d'arriver à de meilleurs rendements, les conditions physico-chimiques de culture de cette levure sur lactosérum doux déprotéiné enrichi ont été optimisées [7].

La croissance de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi a permis, dans un premier temps, d'étudier la cinétique décroissance de cette souche sur lactosérum déprotéiné (Fig. 3).

Le lactose initialement présent est métabolisé au bout de 10 heures de culture. La production de biomasse s'élève alors à 11 g/l. Après la phase exponentielle, on remarque que la vitesse spécifique de production de biomasse diminue plus rapidement que la vitesse spécifique d'utilisation du substrat. Ce qui se traduit par une baisse du rendement instantané.

Selon [10], l'apparition d'éthanol à ce moment-là, puis son accumulation dans le milieu explique ce phénomène, dans la mesure où une partie du substrat est utilisée pour la formation de métabolites secondaires au dépend de la production d'énergie nécessaire à la synthèse de la biomasse.

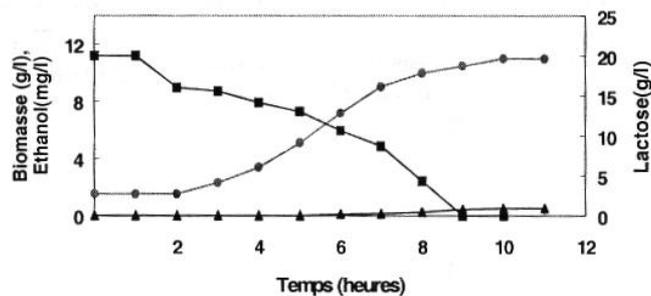


Fig. 3: Culture discontinue en réacteur de 2 l de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 800 tr/min)
Variation de biomasse (-●-), de la concentration en lactose (-■-) et de la production de l'éthanol (-▲-) en fonction du temps

Deux expérimentations ont été menées dans ces conditions, mais avec deux vitesses d'agitation différentes. La première culture a été effectuée avec une vitesse d'agitation élevée de 800 tr/mn. Elle a permis l'obtention de 11 g/l de biomasse en 10 heures, à partir de la totalité du lactose initial (Fig. 4). Il faut noter aussi qu'au cours de la phase exponentielle, on observe une nette diminution du pourcentage de saturation en oxygène dissous (Fig.5).

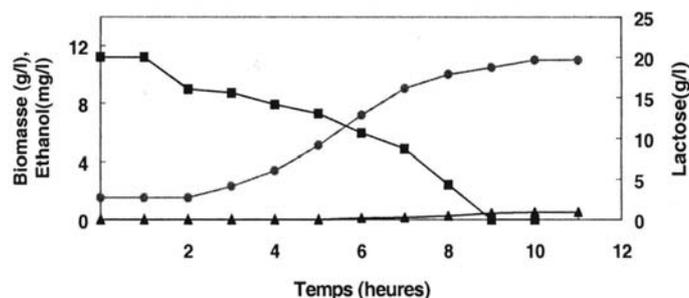


Fig. 4: Culture discontinue en réacteur de 2 litres de *Kluyveromvces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 800 tr/min)
Variation de biomasse (-●-), de la concentration en lactose (-■-) et de la production de l'éthanol (-▲-) en fonction du temps

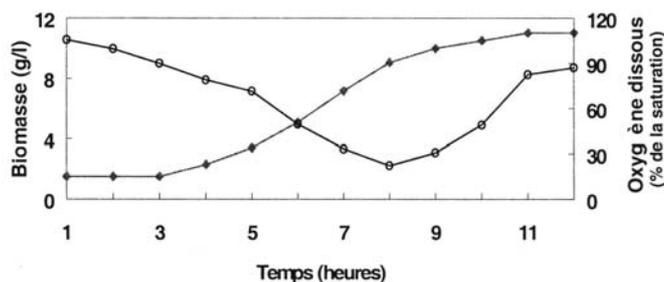


Fig. 5: Culture discontinue en réacteur de 2 litres de *Kluyveromvces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 800 tr/min)
Variation de biomasse (-●-), de la concentration en oxygène (-○-) en fonction du temps

Elle arrive à un minimum de 13 % de la saturation. Le seuil critique d'inhibition (estimé par la plupart des auteurs à 10 % de la saturation) n'a pas été atteint. L'oxygène dissous est fortement utilisé dans les réactions de biosynthèses cellulaires. Il est générateur d'énergie. Et lorsque, la culture est conduite dans des conditions d'agitation différente 400 tr/mn (Fig. 6), les résultats obtenus sont voisins de ceux enregistrés lors de la culture agitée à 800 tr/mn. On note alors, une diminution de la vitesse spécifique de la production de biomasse.

En effet, pendant la phase exponentielle de croissance, la diminution de la concentration en oxygène dissous atteint un minimum de 45 % de la saturation (Fig. 7). Ce qui favorise une production faible en éthanol, au bénéfice de la synthèse de biomasse. On voit ainsi, qu'avec une agitation rapide, la dissolution de l'oxygène

étant plus grande. Ceci donne de meilleurs résultats. Ainsi, l'agitation permet l'introduction de l'air dans le milieu de culture.

Ce qui favorise la formation de nouvelles cellules et limite ainsi de façon appréciable la production d'éthanol. En même temps, l'agitation permet aussi l'évacuation du gaz carbonique produit lors des échanges cellulaires et le renouvellement du microenvironnement cellulaire par l'apport de nouvelles substances nutritives.

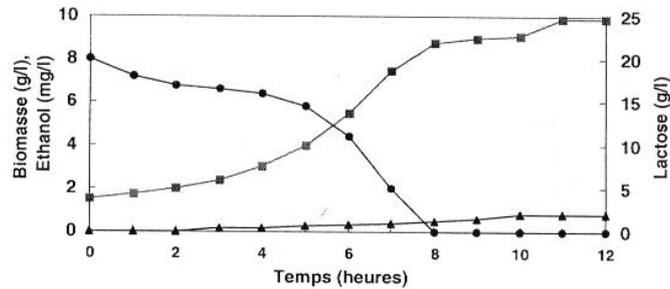


Fig. 6: Culture discontinue en réacteur de 2 litres de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 400 tr/min)
Variation de biomasse (-■-), de la concentration en lactose (-●-) et de la production de l'éthanol (-▲-) en fonction du temps

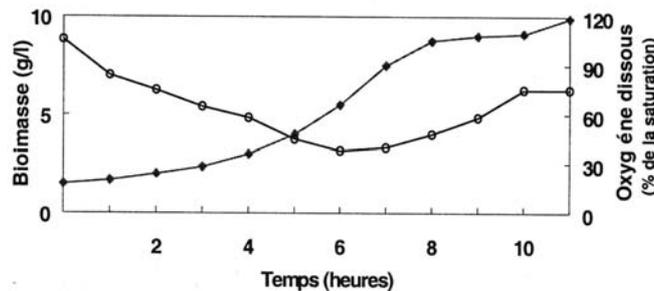


Fig. 7: Culture discontinue en réacteur de 2 litres de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi (agitation 400 tr/min)
Variation de biomasse (-◆-), de la concentration en oxygène dissous (-○-) en fonction du temps

3.3 Culture en réacteur de 5 litres

La culture de *Kluyveromyces fragilis* en réacteur de 5 litres a été conduite avec du lactosérum dont la concentration initiale en lactose est de 64 g/l diluée à 30 g/l. Dans ces conditions, la totalité du lactose initialement présent est transformée en 14,5 g/l de biomasse (Fig. 8). En effet, après une phase latence qui dure environ 3 heures, la phase exponentielle se met en place avec un taux de croissance de 0,40 h⁻¹. Un taux relativement élevé par rapport à celui enregistré en réacteur de 2 litres.

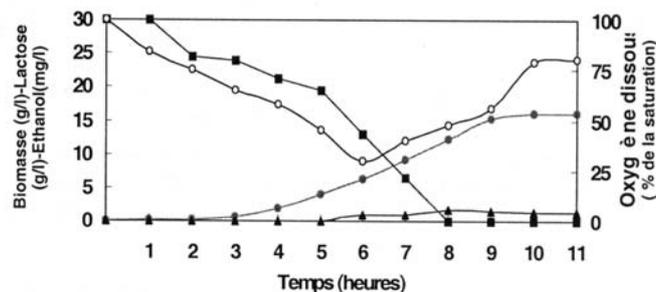


Fig. 8: Culture discontinue en réacteur de 5 litres de *Kluyveromyces fragilis* sur lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de biomasse (-●-), de l'utilisation du lactose (-■-), la production de l'éthanol (-▲-) et de la concentration en oxygène dissous (-○-) en fonction du temps

La totalité du lactose est métabolisé entièrement au bout de 8 heures, le rendement atteint 48 %. Nous avons constaté qu'en utilisant un réacteur de 5 Titres, on obtient un meilleur taux en biomasse. Cette augmentation est reliée à la capacité du réacteur à transférer l'oxygène dissous vers les cellules microbiennes.

La mesure du K_{La} , coefficient traduisant la capacité de transfert d'un réacteur, a été effectuée par la méthode statique et représentée sur le graphe de la figure 9. Le K_{La} calculé à partir des résultats expérimentaux a été estimé à 110 h⁻¹.

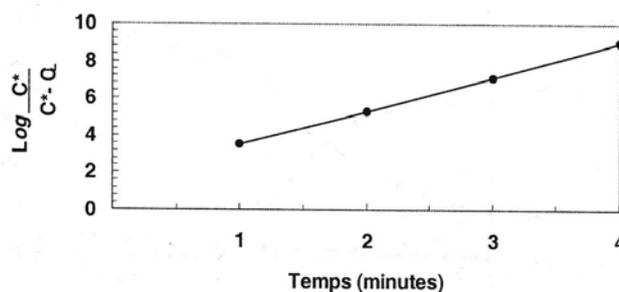


Fig. 9: Détermination graphique du K_{La}

3.4 Culture continue

En vue de connaître le mieux possible le comportement de *Kluyveromyces fragilis* en culture continue, les cinétiques de production de biomasse, de disparition du lactose et d'apparition d'éthanol ont été étudiées aux taux de dilutions suivants 0,1 ; 0,15 ; 0,20 ; 0,25 ; 0,30 ; 0,35 ; 0,38 h⁻¹ (Fig. 10).

Nous avons constaté qu'aux faibles taux de dilutions ($D \leq 0,2$ h⁻¹), il y a une absence totale du lactose résiduel dans le réacteur. Après 20 à 30 heures de stabilisation de la culture à $D = 0,10$ h⁻¹ et $0,15$ h⁻¹, une quantité très faible d'éthanol est mesurée (0,03 mg/l à 0,08 mg/l). A partir de $D = 0,2$ h⁻¹, la concentration en éthanol commence à augmenter légèrement pour atteindre une valeur de 0,5 mg/l.

Le lactose n'est plus totalement métabolisé quand $D \geq 0,25$ h⁻¹. La quantité en éthanol produite va en augmentation avec l'élévation du taux de dilution.

Par ailleurs, quand le taux de dilution augmente, on observe un lessivage progressif du fermenteur par une diminution de la biomasse, accompagné d'une production d'éthanol, ce qui indique une limitation importante de la vitesse de croissance.

Deux raisons peuvent expliquer ce phénomène. Une déficience dans le milieu d'éléments nutritifs (substrat limitant) et une aération insuffisante due à une oxygénation inadéquate [6]. Par ailleurs, la productivité augmente en fonction du taux de dilution jusqu'à $D = 0,25$ h⁻¹. Son optimum est de 2,44 g/litre/h (Fig. 10). Elle est comparable à celle obtenue par [1] en utilisant une souche de *Candida curvata*. Vananuvat [12] obtient une productivité de 2 g/litre/h, dans nos mêmes conditions opératoires à $D = 0,18$ h⁻¹ en utilisant *Kluyveromyces fragilis*.

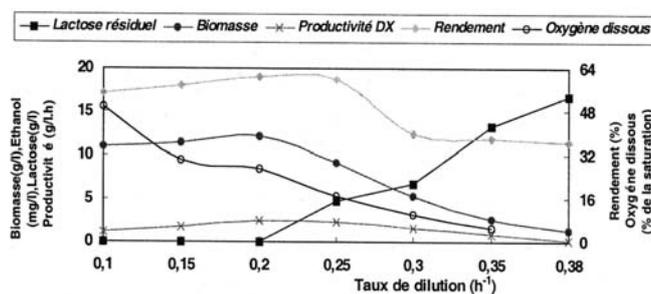


Fig. 10: Culture continue de *Kluyveromyces fragilis* sur le lactosérum déprotéiné enrichi. Variation de biomasse (-●-), du lactose (-■-), de la productivité horaire (-x-), du rendement global (-⊗-) et de la saturation en oxygène dissous (-○-) en fonction du temps

La croissance de *Kluyveromyces fragilis*, en culture continue à un taux de 0,2 h⁻¹ sur du lactosérum dilué à 2 % de lactose, donne le rendement le plus élevé (61 %). Un rendement légèrement inférieur à celui obtenu par [12], soit 72,5 % à $D = 0,18$ h⁻¹, mais largement supérieur au rendement obtenu mêmes conditions de culture.

Estimation de la réduction de la pollution du lactosérum par mesure de la DCO - Les valeurs de la demande chimique de l'effluent à l'entrée et à la sortie du bioréacteur de 2 litres en culture discontinue figurent dans l'histogramme de la figure 11, l'effluent est obtenu par élimination des levures par centrifugation.

Ces résultats montrent l'augmentation de l'efficacité de l'épuration avec l'augmentation du temps de culture.

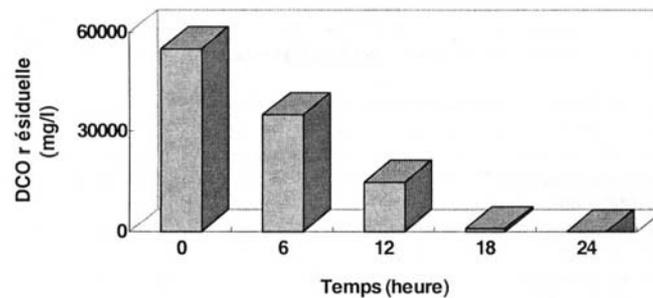


Fig. 11: Evolution de la DCO en culture discontinu de *Kluveromyces fragilis* en fonction du temps de culture

Par exemple, en augmentant le temps de 6 à 24 h, la réduction de l'abattement de la DCO passe de 36 à 99 %. La réduction de la DCO est comparable à celle obtenue par [12, 5]. Selon [8], la diminution de la DCO peut être expliquée par l'utilisation de la matière organique présente dans le milieu par les micro-organismes afin de répondre à leur besoin en énergie nécessaire aux réactions de biosynthèse cellulaires en présence d'oxygène.

En culture continue, nous avons étudié l'influence du taux de dilution sur l'efficacité de l'épuration par mesure de la DCO résiduelle.

L'histogramme de la figure 12 montre que la DCO résiduelle ainsi que son abattement dépendent fortement du taux de dilution.

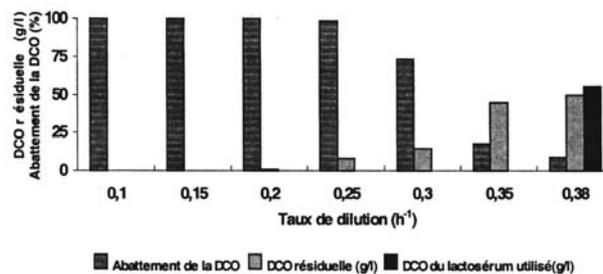


Fig. 11: Evolution de la DCO résiduelle et de l'abattement de la DCO en culture continu en fonction du taux de dilution

L'épuration de l'effluent est presque complète à des taux de dilution inférieurs à $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$, au-delà de ce taux, on assiste à une réduction de l'abattement et par conséquent de l'augmentation de la DCO résiduelle. Par ailleurs, elle reste élevée dans l'effluent obtenu en culture continue à $D = 0,38 \text{ h}^{-1}$, du moment qu'on assiste à un lessivage progressif de la culture.

Agnès [1] met en évidence le même comportement de *Candida curvata* à différents taux de dilution. De même, Ghaly et Singh [5] utilisent des taux de dilution relativement faibles (inférieur à $0,2 \text{ h}^{-1}$ afin d'arriver à une meilleure épuration de l'effluent et par conséquent de réduire potentiellement la pollution provoquée par le rejet du lactosérum dans les eaux résiduaires.

4. CONCLUSION

Pour être économiquement compétitif, la production de biomasse sur lactosérum doit être réalisée avec une conversion maximale du lactosérum en biomasse et une productivité élevée en bioréacteur. Cette étude préliminaire sur la connaissance des conditions de culture de *Kluveromyces fragilis*, ainsi que sa cinétique de croissance en culture discontinue sur le lactosérum permet de conclure que la culture de cette levure dans un réacteur de deux litres agité à deux vitesses d'agitation différentes montre que cette levure est sensible à l'effet Pasteur. Le rendement maximum en biomasse est de 55 %, quand le bioréacteur est agité à 800 tr/mn. Cette souche présente un métabolisme fermentaire aérobie avec une faible production en éthanol. De meilleurs résultats ont été obtenus avec un réacteur de cinq litres, car il permet un meilleur transfert en oxygène. Le taux de croissance atteint une valeur de $0,40 \text{ h}^{-1}$ la production de biomasse produite est de 14,5 g/l.

D'après les résultats, il semblerait donc que *Kluyveromyces fragilis*, soit une levure intéressante pour l'épuration des effluents chargés en lactosérum. L'épuration totale du lactosérum est obtenue avec une culture continue à $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$.

REFERENCES

- [1] N. Agnès, 'Production de Protéines à partir de Lactosérum Brut', Thèse de 3^{ième} cycle, Université de Lyon, 1986.
- [2] F.J. Castille et al., 'High-cell Density Cultivation of Dissacharidies in Oxygen limited Batch Culture', Biotechnology and Bioengineering, Vol. 49, pp. 621-628, 1996.
- [3] M.K. Dubois et al., 'Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances', Anal. and Chem. Jour., 28, 350, 1956.
- [4] J. Fiedurck et J. Szczodrak, 'Selection of Strain, Culture Conditions for Optimum Production of β galactosidase from *K. fragilis*', Art. Microbiologica Polonica, Vol. 3, n°1, pp. 57-65, 1994.
- [5] A.E. Ghaly et R.K. Singh, 'Pollution Potential Reduction of Cheese Whey through Yeast Fermentation', Art. Biochemistry and Biotechnology, Vol. 22, pp. 220-228, 1989.
- [6] H. Kallel et al., 'Optimisation d'une Culture Continue de *K. fragilis* sur un Ultrafiltrat de Lactosérum. Influence des Minéraux et de Vitamines sur la croissance et le Métabolisme', Rev. Microbio. Aliments - Nutrition, Vol. 9, pp. 309-317, 1991.
- [7] S. Kebbouche, 'Valorisation du Lactosérum par la Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires à partir de Levures Locales', Thèse de magister, Ecole Nationale Polytechniques, Alger, 1998.
- [8] R.C. Loehr, 'Pollution Control for Agriculture', Academic Press, New York, 1984.
- [9] G. Moulin, 'Etudes Physiologiques de *K. fragilis*, Conséquences pour la Production de Levures sur Lactosérum', Le lait, N°607, pp. 323332, 1981.
- [10] M. Nagashima, 'Progress in Ethanol Production with Yeasts', in H. Verachtert and R. De Mot, 'Yeast Biotechnology and Biocatalysis', Ed. Dekker, N.Y, pp. 57-87, 1990.
- [11] A. Touzi et al., 'Production de Protéines d'Organismes Unicellulaires à partir du Lactosérum avec *Kluyveromyces fragilis*', Rapport HCR, CDTN, 1991.
- [12] J. Vananuvat et J. Kinsella, 'Production of Yeast Protein from Crude Lactose by *Saccharomyces fragilis* Batch Cultures Studies', Journal of Food Science, Vol 40, pp. 330-341, 1975.