

Thèse

*En vue de l'obtention du diplôme de Magister
en Génie de l'Environnement*

Option : Biotechnologie

Thème

Enrichissement du lactosérum par voie biologique
pour la production de lactoprotéines levurées, en
vue de leur incorporation en alimentation animale

Présentée par: M^{lle} **BOUANANE Nabila Amel**

Jury

Président	: Mme HELLAL A.	Professeur ENP
Promoteur	: Mr BELLAL M. M.	Maître de conférence INA
Co-promoteur	: Mr MAMERI N.	Professeur ENP
Examineurs	: Mme MAMERI D.	Maître de conférence ENP
	Mme ABDI N.	Chargé de cours ENP
	Mme ZOUGLACHE A.D.	Chargé de cours ENP

Dédicaces

Je dédie ce travail à tous
ceux qui me sont chers

Amel

Remerciements



Au terme de ce travail, je tiens à remercier vivement ;

- Mr **BELLAL M. M.**, Maître de conférence à l'INA pour avoir accepté de diriger ce travail et pour la confiance qu'il m'a témoignée.
- Mr **MAMERI N.**, Professeur à l'ENP pour m'avoir permis d'effectuer mes travaux au sein du laboratoire de biotechnologie.
- Mme **HELLAL A.**, Professeur à l'ENP pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.
- Mme **MAMERI D.**, Maître de conférence à l'ENP pour sa bienveillante attention quant à l'examen de ce travail.
- Mme **ABDI N.**, Chargé de cours à l'ENP et Mme **ZOUGLACHE A. D.**, Chargé de cours à l'ENP pour l'honneur qu'elles me font d'accepter d'être membres de ce jury et de juger ce travail.
- Mr **GHRIB H.**, Chargé de cours à l'ENP pour son aide et ses précieux conseils d'orientation.

Je dois aussi remercier pour leurs chaleureux accueils et la constante sympathie dont ils ont fait preuve :

- Mlle **AOUCHER Z.**, Responsable du laboratoire central de l'ONAB d'Alger, ainsi que tout le personnel technique.
- Mme **MOULA F.** et Mme **NADJAI K.** du laboratoire central de l'ENCG d'Alger.
- Mr **SEBAOU R.** et Mme **AMALOU H.** du laboratoire de l'ORLAC de Boudouaou.
- Mr **BOUSNEDJI R.**, Responsable du laboratoire de contrôle de la qualité d'El Harrach.
- Mr **BENOUDAH A.** et Mr **BOUABID** du laboratoire militaire d'El Harrach.
- Mr **CHAKIB** ainsi que toute l'équipe du laboratoire de Biologie Marine de l'ISN de Bab Ezzouar.

J'adresse également l'expression de ma profonde reconnaissance ;

- Au Dr **MOUSSOUS M.** et à Mme **GHANA H.** pour leurs encouragements quant à la réalisation de cette thèse.
- A Messieurs **BOUANANE R.** et **KEROUANI A.** pour avoir assuré la saisie de ce document.
- A tous mes amis et collègues de l'ONAB.

Que tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. LE LACTOSERUM.....	4
1.1. Composition biochimique du lactosérum	4
1.2. Les protéines sériques	4
1.3. Procédés de valorisation du lactosérum	5
2. LES LEVURES LACTIQUES	8
2.1. Caractéristiques des levures.....	8
2.2. Métabolisme des levures	8
2.3. Biosynthèse des acides aminés.....	9
2.4. Biosynthèse des lipides	9
2.5. Définition officielle de la levure aliment	10
2.6. Aspect toxique de la levure aliment	10
2.7. Procédés industriels de production de levures sur lactosérum.....	12
2.8. Utilisation des levures dans l'alimentation.....	14
2.8.1. En Alimentation humaine	14
2.8.2. En alimentation animale	14
3. CINETIQUE DE CROISSANCE MICROBIENNE	14
1. La phase de latence	15
2. La phase de départ	15
3. La phase de croissance ou exponentielle.....	15
4. La phase de ralentissement	16
5. La phase stationnaire.....	16
6. La phase de déclin.....	16
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	17
1. LE LACTOSERUM.....	18
1.1. Origine du lactosérum	18
1.2. Analyses physico-chimiques du lactosérum frais	18
1.2.1. Détermination de l'acidité	18



1.2.2. Détermination de la matière sèche	18
1.2.3. Détermination des cendres	18
1.2.4. Détermination des Chlorures	18
1.2.5. Dosage de l'Azote Total	18
1.2.6. Dosage de l'Azote non Protéique	18
1.2.7. Dosage du Lactose	20
1.2.8. Dosage et identification des acides gras composants la matière grasse du lactosérum	20
1.2.9. Dosage des éléments minéraux	20
1.3. Analyse microbiologique du lactosérum frais	20
1.3.1. Détermination de la flore totale	20
1.3.2. Recherche et dénombrement des coliformes	20
1.3.3. Identification présomptive d' <i>Escherichia coli</i>	21
1.3.4. Recherche et dénombrement des levures et des moisissures	21
1.3.5. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes	21
1.3.6. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	22
1.3.7. Recherche et dénombrement des clostridium sulfitoréducteurs	22
1.4. Étude de l'évolution de l'acidité du lactosérum conservé à température ambiante et à 4°C	22
2. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LEVURE CANDIDA CURVATA	22
2.1. Classification	22
2.2. Origine de la souche	23
2.3. Etude des caractéristiques morphologiques de <i>Candida curvata</i>	23
2.3.1. Présentation des colonies sur milieu solide	23
2.3.2. Observation microscopique de la cellule végétative	24
2.4. Etude des caractéristiques physiologiques de <i>Candida curvata</i>	24
2.4.1. Test de fermentation et d'assimilation des substrats carbonés	24
2.4.2. Test d'assimilation des composés azotés	24
3. ETUDE DE LA CINETIQUE DE CROISSANCE DE CANDIDA CURVATA EN VUE DE LA PRODUCTION DE LACTOPROTEINES LEVUREES	24
3.1. Déprotéinisation du lactosérum	24
3.2. Supplémentation du lactosérum en facteurs nutritionnels	25



3.3. Conduite de la fermentation.....	26
3.3.1. Préculture.....	26
3.3.2. Choix du pH de culture.....	26
3.3.3. Choix de la température de croissance.....	26
3.3.4. Culture en fioles d'Erlen Meyer.....	26
3.3.5. Culture en minifermuteur.....	26
3.4. Suivi de la fermentation.....	27
3.4.1. Mesure de la croissance.....	27
3.4.2. Calcul des paramètres de croissance.....	27
3.4.3. Dosage du lactose résiduel.....	27
3.4.4. Dosage de l'éthanol.....	28
3.4.5. Rendement en biomasse.....	28
4. RECUPERATION ET ANALYSE DU PRODUIT FINAL.....	28
4.1. Analyse bactériologique.....	28
4.2. Récupération de la biomasse.....	28
4.3. Analyse biochimique.....	28
4.3.1. Détermination de la teneur en acides nucléiques.....	28
4.3.2. Extraction et dosage des lipides totaux.....	29
4.3.3. Dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	29
4.3.4. Dosage des protéines.....	30
4.3.5. Dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance.....	30
4.3.6. Dosage de la vitamine E.....	30
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....	31
1. VALEUR ALIMENTAIRE DU LACTOSERUM.....	32
1.1. Composition biochimique du lactosérum de Boudouaou.....	32
1.1.1. Composition en acides aminés des protéines du lactosérum.....	32
1.1.2. Composition en acide gras des lipides du lactosérum.....	33
1.1.3. Composition de la matière minérale du lactosérum.....	34
1.2. Qualité hygiénique du lactosérum de Boudouaou.....	35
1.3. Effet de la réfrigération sur la conservation du lactosérum.....	36

2. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LEVURE <i>CANDIDA CURVATA</i>	37
2.1. Caractéristiques morphologiques.....	37
2.2. Caractéristiques physiologiques.....	40
3. UTILISATION DU LACTOSERUM BRUT POUR LA PRODUCTION DE LACTOPROTEINES LEVUREES	41
3.1. Cinétique de croissance comparée de <i>Candida curvata</i> sur lactosérums brut et déprotéiné.....	41
3.1.1. Paramètres de croissance de <i>C. curvata</i> cultivée sur lactosérum déprotéiné.....	41
3.1.2. Paramètres de croissance de <i>C. curvata</i> cultivée sur lactosérum brut	42
3.1.3. Conclusion.....	43
3.2. Optimisation du procédé en discontinu de la culture de <i>C. curvata</i> sur lactosérum brut.....	44
3.2.1. Influence de la variation du pH sur la croissance de <i>C. curvata</i>	44
3.2.2. Influence de la température sur la croissance de <i>C. curvata</i>	45
3.2.3. Influence de la concentration en sucre sur la croissance de <i>C. curvata</i>	46
3.2.4. Influence de la nature de la source azotée sur la croissance de <i>C. curvata</i>	47
3.2.5. Conclusion.....	49
4. VALEUR ALIMENTAIRE DES LACTOPROTEINES LEVUREES OBTENUES	50
4.1. Qualité microbiologique : Influence de la flore endogène sur la cinétique de <i>C. curvata</i> cultivée sur lactosérum brut	50
4.2. Qualité nutritionnelle de la biomasse obtenue.....	51
4.2.1. Teneurs en acides nucléiques.....	51
4.2.2. Teneurs en lipides et en acides gras totaux	52
4.2.3. Teneurs en acides aminés	54
4.2.4. Teneur en vitamine E	57
4.2.5. Conclusion.....	57
CONCLUSION GENERALE	58
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62
ANNEXE	72

INTRODUCTION

Face au problème de pollution de plus en plus croissant que pose le lactosérum, de nombreuses études ont été réalisées dans le but d'apporter des solutions pour sa valorisation.

En Algérie, les quantités importantes de lactosérum ne cessent d'être rejetées créant ainsi une source potentielle de pollution. Le lactosérum constitue un excellent milieu de culture pour les micro-organismes par sa composition en vitamines, en minéraux et en lactose, mais c'est également un agent de pollution redoutable. En effet, sa demande biologique est comprise entre 40.000 à 50.000 mg d'oxygène par litre de lactosérum (**Ghaly et Singh, 1989**).

Cependant, de nombreux travaux ont montré qu'il était possible d'utiliser le lactosérum en alimentation humaine et animale (**Kallel, 1993**). En effet les protéines du lactosérum ont la plus grande efficacité alimentaire par leur haute valeur biologique et leur composition en acides aminés (**Sanchez et al., 1997**).

La richesse du lactosérum en lactose a entraîné la mise au point de divers procédés de fabrication de levures aliment. De nombreux auteurs ont montré que les souches appartenant aux genres *Kluyveromyces*, *Candida* et *Torulopsis* sont les mieux adaptées à cette production (**Bel Industries, 1997**).

La culture de micro-organismes à grande échelle pour la production de protéines microbiennes consommées par l'homme et par l'animal avait été envisagée comme une solution à la pénurie alimentaire qui régnait en Allemagne lors de la première guerre mondiale.

La société Bel a déposé en 1956 le premier brevet de culture de levures sur lactosérum déprotéiné. Les levures utilisées sont formées de 80 % de souches de *Kluyveromyces fragilis* et de 20 % de *Kluyveromyces lactis*.

La société BP quant à elle, visant à valoriser tous les types de lactosérums, a préconisé en 1977, la production de lactoprotéines levurées sur lactosérum acide à l'état natif, et sur lactosérum semi-concentré.

Les lactoprotéines levurées et les levures lactiques obtenues se caractérisent par une haute teneur en protéines et un bon équilibre en acides aminés indispensables. Des essais d'incorporation en remplacement du tourteau de soja en alimentation animale ont montré leur efficacité nutritionnelle en aviculture, en alimentation bovine et plus récemment en aquariophilie, en pisciculture et en aquaculture (**Kallel, 1993**).

Il est important de signaler qu'actuellement en Algérie, l'emploi des levures à l'échelle industrielle se limite uniquement à la production de levures boulangères, alors que les matières premières destinées à l'alimentation animale (soja, maïs, vitamines, oligo-éléments...) sont importées, ce qui contraint à une dépendance économique accrue.

Environ 200 000 tonnes de tourteaux de soja sont importées annuellement, ce qui représente l'équivalent de 44 millions de Dollars et ce chiffre progresse malheureusement d'année en année.

L'objectif de cette étude est de valoriser le lactosérum brut par un procédé simple qui permet l'élimination totale du lactose de l'effluent tout en produisant une quantité importante de lactoprotéines levurées de bonne qualité, exempte de pathogènes, facilement digestibles, destinée à l'alimentation animale.

La culture envisagée n'est pas aseptique, le milieu devra être le plus acide possible. Les conditions de culture doivent être optimisées afin de limiter les coûts de production.

La levure *Candida curvata*, a été recherchée pour sa capacité à utiliser le lactose, et pour ses potentialités de production de protéines à partir de lactosérum (Agnes, 1986; Kallel, 1993).

Une comparaison de deux cinétiques en discontinu de *C. curvata* sur lactosérum brut, non pasteurisé et sur lactosérum déprotéiné permettra de préciser le comportement de cette souche vis-à-vis de la flore endogène et de calculer le rendement en biomasse en présence et en absence des protéines sériques.

La composition de la crème obtenue permettra de définir la qualité du produit final par rapport aux autres levures lactiques utilisées en alimentation animale.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE LACTOSERUM

1.1. Composition biochimique du lactosérum

Le lactosérum est un produit issu de l'industrie fromagère, défini comme étant un lait privé de sa caséine. Sa composition varie en fonction du processus de fabrication dont il est issu et de l'origine du lait (**Boudier et Luquet, 1980**) A cet égard on peut distinguer selon l'acidité deux types de lactosérums (**Méréo, 1971**).

- les lactosérums acides (acidité supérieure à 18 °Dornic), produits par les fromageries de types pâtes fraîches et pâtes molles.
- les lactosérums doux (acidité inférieure à 18 °Dornic), produits par les fromageries de type pâtes pressées et cuites.

C'est le sérum doux qui est le plus employé dans l'industrie, il contient environ 63 à 75 g de matière sèche par litre, dont 45 à 60 g de lactose, 7 à 10 g de matières azotées, 6 à 8 g de matière saline et 1 à 3 g de matière grasse (**Alais, 1981; Sottiez, 1985**).

La majeure partie des vitamines du lactosérum sont hydrosolubles. On note particulièrement des quantités importantes en riboflavine (B₂), en thiamine (B₁), en acide pantothénique et en vitamine C.

Le lactosérum contient 0,5 mg/l de vitamine E, vitamine indispensable dans le traitement des myodistrophies des veaux et dans l'encéphalomalacie des volailles.

Un régime pauvre en tocophérols favorise le développement d'une dystrophie musculaire aiguë chez les bovins (**Blum, 1989**).

1.2. Les protéines sériques

Les matières azotées totales du lactosérum représentent 65 % de protéines et 35 % d'azote non protéique : acides aminés, nucléotides, azote uréique et ammoniacale. Les différentes méthodes de séparation permettent de distinguer quatre fractions protéiques (**Agnes, 1986**).

- | | |
|-----------------------|-------------------------------|
| - Les globulines 10 % | - Les protéoses peptones 10 % |
| - Les albumines 75 % | - Les protéines mineures 5 % |

Certaines protéines du lactosérum sont synthétisées dans la glande mammaire (α lactalbumine, β lactoglobuline) et d'autres proviennent du sang (sérum albumine) (**Guillou et al., 1976**).

Rappelons que la valeur nutritionnelle d'une protéine est représentée par sa composition en acides aminés (**Roger et al., 1980**). Le tableau 1 montre que la composition des protéines sériques est particulièrement équilibrée quelles que soient les protéines de références choisies (oeuf, caséine, soja ou norme FAO).

Tableau 1 : Composition en acides aminés essentiels de différentes protéines alimentaires
(Alais, 1981)

g/100 g de protéines	Protéines du sérum	Albumine de l'oeuf	Caséine	Soja	Equilibre recommandé F.A.O.
Isoleucine	6,55	6,45	5,80	6,10	4,20
Leucine	14,00	8,30	9,50	7,85	7,00
Lysine	10,90	7,05	7,60	6,20	5,10
Méthionine	2,35	3,40	2,95	1,35	2,60
Cystéine	3,15	2,25	0,40	1,35	2,60
Phénylalanine	4,05	5,80	5,40	5,10	7,30
Tyrosine	4,08	4,05	5,70	3,40	7,30
Thréonine	6,70	5,15	4,00	1,25	3,50
Tryptophane	3,20	1,50	1,30	5,30	1,10
Valine	6,85	7,15	6,80	4,60	4,80

Les propriétés de ces protéines sont remarquables d'une part au plan nutritionnel grâce à leur richesse en acides aminés soufrés (De la Bourdenaye, 1974; Chambre, 1984), d'autre part au plan fonctionnel : solubilité, aptitude au moussage, propriétés émulsifiantes et gélifiantes, stabilité thermique, rétention d'eau (Robin *et al.*, 1996)

Ces propriétés confèrent aux séroprotéines de nombreuses applications. Elles sont incorporées dans les boissons (Crippen et Jeon, 1983), dans les produits carnés (Dewit et Hontelez, 1981), dans les crèmes desserts (Humbert, 1981), dans les pâtes alimentaires (Towler, 1982), en pâtisserie (Mann, 1984) et en fromagerie (Broom et Willman, 1982). Les hydrolysats de protéines et les immunoglobulines sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique (Roger *et al.*, 1981) et comme produit diététique (Sanchez *et al.*, 1997)

1.3. Procédés de valorisation du lactosérum

Les procédés d'ultrafiltration sont, aujourd'hui, couramment utilisés comme première étape de fractionnement du lactosérum. On obtient ainsi un concentré de protéines sériques de haute qualité nutritionnelle et un perméat contenant essentiellement du lactose, des vitamines et des sels minéraux (Kallel *et al.*, 1991).

Les perméats issus des unités d'ultrafiltration sont des liquides dorés clairs, acides, légèrement salés. Ils subissent une électrodialyse afin de réduire leur taux en éléments minéraux (Kosikowski, 1981).

Les installations d'osmose inverse permettent d'atteindre un extrait sec de 24% (**Pepper, 1987**). Le lactose anhydre a la propriété d'absorber les saveurs, il est utilisé dans la fabrication du café instantané, et améliore son arôme (**Decleire et al., 1991**).

Les membranes de nanofiltration présentent des perméabilités sélectives pour les ions (**Macoun et al., 1991**) et permettent aussi de séparer les ions de molécules organiques à faible poids moléculaire (**Perry et Linder, 1989**).

La dessiccation du lactose est très répandue dans certains pays. On considère qu'aux USA près de 70% de sérum traité industriellement est soumis à la dessiccation. Les quantités importantes de lactosérum en poudre trouvent plusieurs débouchés: pour l'allaitement des veaux, pour la fabrication de crèmes glacées, de pains et de laits infantiles (**Kosokowski, 1979**).

En utilisant la chromatographie d'absorption et d'affinité, il est possible de séparer les immunoglobulines, la lactoferrine et la lactopéroxydase des lactalbumines et lactoglobulines. Ces deux protéines sont destinées à être incorporées dans les laits pour nourrisson (**Decleire et al., 1991**).

Egalement le lactosérum peut être soumis à de nombreuses fermentations conduisant à la production de levures, d'acides, de solvants, d'enzymes et de vitamines (Tab. 2). Des recherches ont montré que **le perméat en poudre peut totalement ou partiellement remplacer le saccharose dans les milieux de culture aussi bien pour la multiplication in-vitro des plantes que pour la culture des cellules végétales en vue de la production de métabolites secondaires** (**Decleire et al., 1991**).

Tableau 2 : Différents produits obtenus par fermentation du lactosérum (Kallel, 1993)

Produits	Micro-organismes	Applications
Levures et champignons Production de protéines et de lipides d'organismes unicellulaires Levures de boulangerie	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Trichosporum cutaneum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus bulgaris</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida curvata</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Penicillium javanicum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Industrielle Industrielle Industrielle
Solvants Ethanol Acétone – Butanol	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Clostridium sp.</i>	Industrielle
Produits alimentaire Lactate d'ammonium	Bactéries lactiques	Industrielle
Biogaz: Méthane	Culture mixte de bactéries anaérobies	Industrielle
Acides alimentaires Lactique Citrique Acétique Itaconique Malique	Bactéries lactiques <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida sp</i> <i>Acetobacter sp</i> <i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Aspergillus terreus</i>	Industrielle Industrielle Industrielle
Gommes alimentaires Xanthane Pullulane Acide alginique Indigane	<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Azobacter vinalandii</i> <i>Beijerincka indica</i>	
Acides aminés	Divers micro-organismes	
Vitamines Riboflavine Vitamine B ₁₂	<i>Ashyba gossypii</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Propioni-bacterium shermanii</i>	
Antibiotiques: Pénicilline	<i>Penicillium sp</i>	
Autres produits Acide hydroxy butrique 2,3 butane-diol Hydrogène Diacétyle Gluconate de calcium Acide propionique Acide pyruvique Galactose	<i>Alcagenes autrophus</i> <i>Bacillus polymyxa</i> <i>Citrobacter intermedius</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Propionibacterium sp</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i>	

2. LES LEVURES LACTIQUES

2.1. Caractéristiques des levures

Les levures sont des champignons microscopiques, de forme unicellulaire, généralement ovoïde et de taille variant de 1 à 30 microns (**Davenport, 1980**).

Les levures font partie du règne des Eucaryotes et possèdent deux modes de reproduction. Une reproduction végétative par bourgeonnement ou par scissiparité et une reproduction sexuée méiotique par sporulation.

Actuellement, la classification des levures la plus reconnue et la plus utilisée est celle proposée par **Lodder (1971)**. Les principales caractéristiques utilisées dans cette classification se basent sur des critères morphologiques, physiologiques et sexuels.

2.2. Métabolisme des levures

Les levures sont des hétérotrophes à métabolisme exclusivement oxydatif ou mixte (oxydatif et fermentaire). Elles sont en général acidophiles. Le pH optimum de croissance se situe entre 3,5-6,5. Mais certaines espèces peuvent se développer dans des milieux très acides (pH 1,5). **Saccharomyces telluris** croit dans un intervalle de pH compris entre 0,9-1,1 (**Davenport, 1980**).

La température optimale de croissance des levures appartenant au genre **Candida** est de 30°C, et celle des levures du genre **Kluyveromyces** peut aller jusqu'à 38°C sans baisse de rendement (**Bayer et Meyrath, 1979**).

En pratique il est souhaitable de travailler à un pH bas et à une température élevée pour réduire les risques de contamination (**Kallel, 1993**).

Les levures assimilent de nombreux substrats carbonés par la voie oxydative (glycolyse) du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire génératrice d'ATP, conduisant à la formation de gaz carbonique et d'eau.

La voie fermentaire stricte, qui n'existe que chez certaines espèces, conduit à la formation d'éthanol et de gaz carbonique en empruntant la voie d'**Embden Meyeroff**. Par contre chez les levures à métabolisme mixte, on observe des possibilités d'autorégulation qui s'exercent en fonction des conditions d'aération du milieu et de sa richesse en sucre (**Guiraud et Galzy, 1980**).

C'est grâce aux travaux de **Keiling** qu'il a été mis en évidence que certaines espèces de levures (**Candida, Kluyveromyces,...**) ont la propriété d'assimiler le lactose (**De La Guerivière, 1981**). Cette découverte constitue un atout déterminant pour les chercheurs de l'industrie fromagère dans la perspective de valoriser le lactosérum riche en lactose.

Le lactosérum et son ultrafiltrat contiennent comme source d'azote uniquement des protéines qui ne sont pas assimilées par les levures (**Larpen, 1985**). Il est donc nécessaire d'ajouter une source d'azote. Ce sont généralement les sels d'ammonium qui sont utilisés.

L'addition de vitamines sous forme d'extrait de levures ou de corn steep liquor permet dans la plus part des cas une augmentation de la vitesse spécifique de croissance et du rendement de conversion du lactose en levures (Agnes, 1986; Kallel, 1993).

La supplémentation du lactosérum par des oligo-éléments tels que le fer, le zinc, et le manganèse dépend des exigences de la souche utilisée (Kallel *et al.*, 1991).

2.3. Biosynthèse des acides aminés

Un grand nombre de levures sont capables d'élaborer à partir de glucides et de sels minéraux les acides aminés nécessaires à la synthèse de leurs protéines.

Bien que ces acides aminés soient un stade transitoire dans cette biosynthèse, ils peuvent être excrétés dans le milieu à la fin de la phase exponentielle (Scriban, 1993). Depuis quelques années, les recherches s'orientent vers la synthèse microbiologique et enzymatique d'acides aminés purs. Une vingtaine d'acides aminés sont maintenant préparés par fermentation. La production mondiale actuelle en lysine et en acide glutamique est dominée par les sociétés japonaises (Douzou *et al.*, 1993).

La méthionine, la lysine et le tryptophane sont les principaux acides aminés ajoutés aux aliments du bétail lorsque les céréales forment la base de l'alimentation.

Des quantités importantes en lysine et en méthionine sont importées par notre pays. L'emploi du tryptophane reste limité par son coût relativement élevé.

2.4. Biosynthèse des lipides

Les levures ont suscité un intérêt particulier ces dernières années comme sources alternatives de lipides destinés à des utilisations alimentaires et industrielles (Hammond et Glatz, 1988). Le taux de lipides dépend de l'espèce, du stade de développement et des conditions de culture (Ratledge, 1989).

L'oléogénicité est liée à la présence chez ces levures, en particulier du genre *Candida*, de l'ATP citrate-lyase, enzyme-clef pour la biosynthèse des lipides à partir de l'acétyl CoA précurseur indispensable des acides gras (Ratledge, 1988).

Le taux de production de lipides augmente proportionnellement avec la concentration en sucre du milieu. L'apport d'azote, particulièrement l'azote organique, stimule davantage la biosynthèse des lipides. L'examen au microscope électronique de la levure *Candida curvata* montre des lipides sous formes de gouttelettes dans le cytoplasme. (Rolph *et al.*, 1989)

Les lipides accumulés sont composés essentiellement de triglycérides, de phospholipides et de stérols. Les caroténoïdes et les sphingolipides constituent les composants mineurs.

Les acides prédominants dans la plus part des *Candida* sont les acides oléique (C_{18:1}) et palmitique (C_{16:0}). Par ailleurs, la teneur en acide stéarique (C_{18:0}) est de l'ordre de 15 % et peut varier d'une souche à l'autre. En outre l'acide linoléique (C_{18:2}) est absent ou présent à de très faibles concentrations selon le milieu de culture (**Moreton, 1985**).

Les acides gras polyinsaturés sont habituellement faibles (C_{18:2}). La présence d'acides gras à chaînes courtes et moyennes est notée. Cette observation est intéressante puisque ces acides gras absents dans les huiles végétales se retrouvent dans le beurre et l'huile de Coprah (**Douste et Mendy, 1988**).

2.5. Définition officielle de la levure aliment

Selon la CEE la levure aliment est une levure tuée, privée de pouvoir fermentaire, séchée, n'ayant subi ni extraction ni rajout

La levure aliment destinée à l'alimentation humaine doit contenir 45 à 52 % de protéines; 5 à 9 % de lipides; 27 à 36 % de glucides et 7 à 9 % de cendres. (**Kallel, 1993**).

2.6. Aspect toxique de la levure aliment

Les acides nucléiques ont un rôle essentiel dans la croissance et la défense de l'organisme. La teneur moyenne dans les levures est de 5 %. D'après **Champagnat et Adrian (1974)**; **Férando et Truhaut (1976)**; **Gérard (1978)** cette teneur ne pose aucun problème pour les animaux. En effet, les espèces animales sont pourvues d'une enzyme, l'uricase qui permet l'oxydation de l'acide urique en allantoin, opération qui évite l'accumulation de celui-ci dans l'organisme.

En alimentation humaine, selon **Kallel (1993)** une consommation de 135 g de levures sèches par jour (durant 9 jours) ne provoque aucun trouble gastro-intestinal chez les volontaires.

Toutefois des méthodes de diminution du taux d'acides nucléiques ont été suggérées, on cite en exemple, l'hydrolyse alcaline, la digestion par la ribonucléase pancréatique, l'utilisation des chocs thermiques. Toutes ces méthodes permettent l'abaissement du taux d'acides nucléiques (**Scriban, 1993**).

La levure lactique utilisée à des fins alimentaires doit répondre à des normes rigoureuses en matière de composition biochimique (Tab. 3) et bactériologique.

Selon **Bel Industries(1997)** la qualité bactériologique de la levure aliment doit répondre aux normes suivantes :

Germes totaux	inférieur à 10 000 germes/g
Coliformes	0 pour 1 g
<i>E. coli</i>	abs dans 0,2 g
Staphylocoques	0 dans 0,1 g
Salmonelles	0 dans 25 g.

Les recherches se poursuivent, et s'orientent vers la sélection de micro-organismes présentant de faible taux en acides nucléiques. Signalons cependant, qu'actuellement des levures vivantes sont utilisées en alimentation animale comme probiotiques par différentes firmes industrielles (Lesaffre Industries, 1999 ; Physan Industries, 1999).

Tableau 3 : Composition de la levure lactique (De La Guerivière, 1981)

a- Composition moyenne de la levure lactique (g/100g)		c- Répartition des acides gras dans la levure lactique(mg/100g)		
Humidité	4,5	Butyrique	C ₄	10
Matières protéiques (N x 6,25) (dont ARN + ADN = 6)	50,0	Laurique	C ₁₂	5
Glucides	30,3	Myristique	C ₁₄	30
Lipides	6,0	Pentadécanoïque	C ₁₅	20
Minéraux	8,1	Palmitique	C ₁₆	575
Choline	0,5	Palmitoléique	C ₁₆	180
Glutathion	0,5	Héptadécanoïque	C ₁₇	50
Vitamine du groupe B	0,07	Stéarique	C ₁₈	85
Vitamine C	0,006	Oléique	C ₁₈	985
		Linoléique	C ₁₈	705
		Linoléinique	C ₁₈	250
		Arachidonique	C ₂₀	5
		Cadoléique	C ₂₀	5
b- Composition en acides aminés de la levure lactique (g/100g)		d- Fractions vitaminique et glucidique de la levure lactique		
Acide aspartique-asparagine	4,3	1- Vitamines (mg/100g)		
<u>Thréonine</u>	2,2	• <u>Vitamines hydrosolubles</u>		
Serine	2,6	Thiamine	B ₁	1,0-1,5
Acide glutamique-Glutamine	8,3	Riboflavine	B ₂	2,5-5,0
Proline	1,5	Nicotinamide	B ₃ ou PP	35,0-45,0
Glycine	1,9	Acide pantothénique	B ₅	8,0-15,0
<u>Cystine-Cystéine</u>	0,5	Pyridoxine	B ₆	0,8-1,2
Valine	2,2	Biotine	B ₈ ou H	0,04-0,09
<u>Méthionine</u>	0,8	Acide folique	BC	1,8-2,0
<u>Isoleucine</u>	2,0	Cobalamine	B ₁₂	0,0005-0,0015
<u>Leucine</u>	3,3	Acide ascorbique vrai	C	65,0-75,0
Tyrosine	1,5	• <u>Vitamines liposolubles</u>		
<u>Phénylalanine</u>	1,5	Tocophérol	E	25,0-45,0
Histidine	1,0	2- <u>Glucides (g/100g)</u>		
<u>Lysine</u>	3,5	Glucose + fructose + galactose		0,250
Arginine	2,5	Mesoinositol		0,005
<u>Tryptophane</u>	0,6	Glycogène		5
Valeurs moyennes pour la levure «Protibel»		Galactomannanes		6
(Les acides aminés essentiels sont soulignés)		Glucogalactanes		14
		Glucomannanes		5

2.7. Procédés industriels de production de levures sur lactosérum

Les premiers essais de production de levures à l'échelle industrielle datent de la deuxième guerre mondiale. C'est en 1944, en Autriche que **Mietke et Dubrow** ont produit de la levure à grande échelle, le rendement pondéral levures/lactose atteint était de 30 % (**Kallel, 1993**).

La société **BEL** a déposé en 1965 le premier brevet de culture de levures sur lactosérum déprotéiné (**De La Guerivière, 1981**). Les levures utilisées sont formées de 80 % de souches de *Kluyveromyces fragilis* et de 20 % de souches de *Kluyveromyces lactis*.

Le lactosérum brut, pasteurisé est déprotéiné par ultrafiltration. Le perméat est ensuite à nouveau pasteurisé puis dilué jusqu'à une concentration de 30 g/l de lactose. La fermentation se déroule en conditions non aseptiques à pH égal 3 et à une température de 34 °C. Le rendement en biomasse est de 55 % et la productivité est de 4,5 g/l/h (**Bel Industries, 1997**).

Le procédé pour la production de lactoprotéines levurées mis au point par la société française BP a été breveté en 1977. Il consiste à enrichir en protéines le lactosérum acide par la croissance en culture continue non stérile, d'une souche de levures du type *Kluyveromyces fragilis*.

Les lactoprotéines levurées obtenues contiennent 4 % d'humidité ; 45 % de protéines ; 3,5 % de matière grasse et 21,5 % de matière minérale. Ces produits sont riches en vitamines hydrosolubles et contiennent tous les acides aminés indispensables (**Molinéro, 1977**).

Les deux modes (continu et discontinu) de fermentation sont possibles pour la production de levures (Tab. 4).

Tableau 4 : Différents procédés industriels de production de biomasse sur lactosérum
(Kallel, 1993)

Procédés	Substrats Lactose g/l	Réacteurs	Rendements g/g	Productivités g/l.h	Micro-organismes
Bel (1983)	Perméat dilué à 20-30 g/l	Le François Continu	0,5	4,5	<i>K. fragilis</i> <i>K. lactis</i> <i>T. bovina</i>
Vienna UKM (1977)	Lactosérum à 45 g/l	Deepjet/ Continu	0,52	4,5	<i>C. intermedia</i>
Kiel (1978)	Lactosérum non dilué	Continu	0,5	2,65	<i>L. bulgaricus</i> <i>C. krusei</i>
BP (1977)	Lactosérum acide à 60-65 g/l	Continu	0,60	-	<i>K. fragilis</i>
Sav (1963)	Lactosérum à 42 g/l	Continu	0,36-0,42	2	<i>C. pseudotropicalis</i> <i>K. fragilis</i>
Wheast (1964)	Lactosérum	Discontin	0,33	-	<i>K. fragilis</i>
Waldhof (1950)	Lactosérum à 38 g/l	Discontin Continu	0,5 0,35	1,5	<i>C. utilis</i>
Polyvit (1944)	Lactosérum déprotéiné	-	0,3	-	<i>Torula sp</i>

La multiplication des souches est réalisée dans des fermenteurs munis de système d'agitation et de régulation thermique. Le plus souvent une régulation du pH est réalisée afin d'améliorer la croissance. Chacun des fermenteurs est caractérisé par une capacité de transfert d'oxygène (K_{la}) exprimée en h⁻¹.

Le rôle du dispositif d'aération des fermenteurs est de fournir aux micro-organismes l'oxygène nécessaire à leur croissance et d'assurer l'uniformité de la suspension microbienne.

Des systèmes autoanalyseurs sont utilisés pour doser en continu le glucose dans le substrat. Les thermocouples et les sondes à résistance sont très employées en fermentation.

On utilise pour la stérilisation des milieux de culture sensibles au traitement thermique des échangeurs de chaleur. Cela permet d'effectuer un traitement à très haute température pendant un temps très court, ce qui limite considérablement la destruction des facteurs de croissance, des protéines ainsi que la production de composés de la réaction de **Maillard**.

Le bioréacteur doit-être stérilisé séparément à la vapeur et le transfert du milieu doit-être fait aseptiquement. Certaines fermentations s'accompagnent d'une forte production de mousse. Des substances additionnées automatiquement en cours de fermentation permettent de réduire la

formation de mousse. Les principaux produits utilisables sont à base de silicone, de copolymères d'oxydes de propylène et d'éthylène. (Scriban 1993).

La mise en oeuvre de bioréacteurs de grand volume implique la préparation d'un inoculum suffisant. Cet inoculum est préparé dans un ou plusieurs bioréacteurs de plus petite taille, intégrés à l'installation de fermentation, eux mêmes ensemencés avec une culture faite au laboratoire.

2.8. Utilisation des levures dans l'alimentation

2.8.1. En Alimentation humaine

Les levures apportent des protéines de qualité dans l'alimentation des sujets suivant un régime végétarien ou d'amaigrissement. Ce sont des adjuvants ou des émulsifiants utilisés en charcuterie. Les levures stabilisent les pâtes et les produits amylacés (croquettes, crêpes, gaufrettes...). Leur pouvoir épaississant augmente la résistance à un choc thermique prolongé des sauces et des potages (Kallel,1993) .

La levure aliment est utilisée comme complément protéique. Il a été montré qu'une consommation journalière de 20 g de levure par enfant et de 30 g par adulte suffit pour contrer le problème de la mal- nutrition dans le monde (De La Guerivière, 1981).

2.8.2. En alimentation animale

Les essais effectués sur volailles montrent qu'en remplaçant le soja par des lactoprotéines levurées (10 %) on obtient des poulets de hautes performances (Molinéro, 1977).

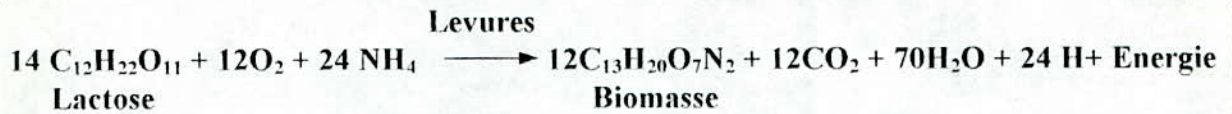
Dans l'alimentation du veau, l'utilisation de 5 % de lactoprotéines levurées en substitution de la poudre de lait permet d'obtenir une bonne croissance sans perturbation de l'indice de transformation.

Les recherches actuelles s'orientent vers l'intégration des probiotiques (préparations microbiennes vivantes) dans l'alimentation animale, comme additifs à effets zootechniques. L'apport de levures de *Saccharomyces cerevisiae* vivantes dans la ration alimentaire de vaches n'a pas eu d'influence sur la production de lait (Brunchwing, 1999).

Par ailleurs, l'efficacité de certains probiotiques est aujourd'hui prouvée et offre des garanties suffisantes pour se substituer dans l'aliment aux antibiotiques facteurs de croissance (Guillot, 1999).

3. CINETIQUE DE CROISSANCE MICROBIENNE

On peut considérer que tout processus dans lequel interviennent des micro-organismes, est caractérisé par une série de réactions chimiques conduisant à la synthèse de cellules à partir de substrats carbonés. Pour une réaction où la biomasse est le seul produit formé Ghaly et Benhassen (1995) proposent dans leur récente étude : Production de levures à partir de lactosérum en batch, la formule suivante:



Le lactose fournit l'énergie nécessaire aux réactions de synthèse et de maintenance et sert également à édifier les constituants cellulaires.

La croissance microbienne est caractérisée par les paramètres suivants:

- X, S, P les concentrations massiques en biomasse, en substrat et en produit (g/l).
- r_x, r_s, r_p les vitesses de production de biomasse X, d'utilisation du substrat S et de production de métabolites P par unité de temps et de volume du milieu (g/l.h)
- $\mu = \frac{r_x}{X}$ la vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
- $Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$ le rendement total en biomasse microbienne.
 X, X₀, S, S₀ représentent les concentrations initiales et finales en cellules et en substrats.
- $t_g = \frac{1}{\mu_{\max}} \ln 2$ le temps de génération ou le temps nécessaire pour que la concentration cellulaire X double. Il varie d'un micro-organisme à un autre et dépend des conditions de culture (h).

La courbe de croissance caractéristique d'un fonctionnement en réacteur fermé (discontinu) révèle plusieurs phases

1. La phase de latence

Il n'y a pas de reproduction cellulaire. Il s'agit d'une période d'adaptation.

2. La phase de départ

Au cours de cette phase la reproduction cellulaire commence.

3. La phase de croissance ou exponentielle

La vitesse de production de biomasse augmente proportionnellement à la concentration cellulaire X. La phase exponentielle correspond à un potentiel de multiplication et de synthèse cellulaire considérable.

En réacteur fermé

$$r_x = \frac{dx}{dt} = \mu x$$

Par intégration à l'expression précédente entre deux valeurs de la concentration X_1 et X_2 on obtient:

$$X_2 = X_1 \exp[\mu (t_2 - t_1)]$$

4. La phase de ralentissement

La courbe de croissance présente un point d'inflexion dû à l'épuisement d'un ou de plusieurs éléments dans le milieu de culture.

5. La phase stationnaire

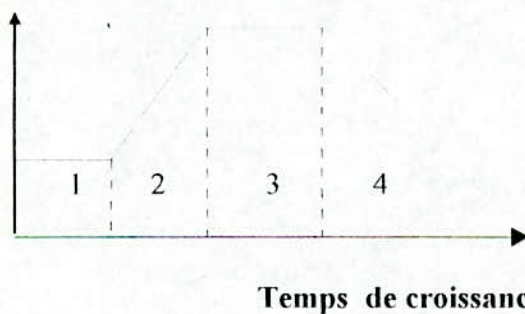
Lorsque la concentration cellulaire atteint sa valeur maximale, la croissance s'arrête. Les cellules conservent cependant une activité métabolique.

6. La phase de déclin

Le taux de mortalité des cellules augmente et par conséquent la concentration en biomasse décroît dans le temps.

Il est évident que la connaissance d'une courbe de croissance microbienne est impérative pour toute conception d'un bioréacteur à l'échelle industrielle. Les quatre grandes phases de croissance sont représentées par la figure 1

Nombre de cellules/ml



- 1) phase de latence,
- 2) phase de croissance,
- 3) phase stationnaire,
- 4) phase de déclin

Fig. 1 : Courbe de croissance microbienne (Scriban,1993)

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. LE LACTOSERUM

1.1. Origine du lactosérum

Les différents échantillons de lactosérum doux utilisés tout au long de cette étude proviennent de l'unité fromagère de Boudouaou.

Le lactosérum est issu de la fabrication du fromage à pâte pressée type EDAM. Le processus de fabrication du fromage adapté à l'unité de Boudouaou est donné dans la figure 2 .

1.2. Analyses physico-chimiques du lactosérum frais

1.2.1. Détermination de l'acidité

La quantité d'acide lactique est déterminée par titrage de l'acidité avec de l'hydroxyde de sodium, en présence de phénolphthaléine comme indicateur. Cette détermination s'effectue sur une prise d'essai de 10 ml de lactosérum. Le résultat est exprimé en degré dornic: 1 degré dornic correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lactosérum (Afnor,1986).

1.2.2. Détermination de la matière sèche

La matière sèche est obtenue par évaporation à 105 °C et dessiccation de 10 ml de lactosérum dans une capsule tarée, avec pesée du résidu (Afnor,1986).

1.2.3. Détermination des cendres

Les cendres sont déterminées par incinération à 530 °C d'une quantité de 10 ml de lactosérum pendant 4 heures dans un four à moufle (Afnor,1986).

1.2.4. Détermination des Chlorures

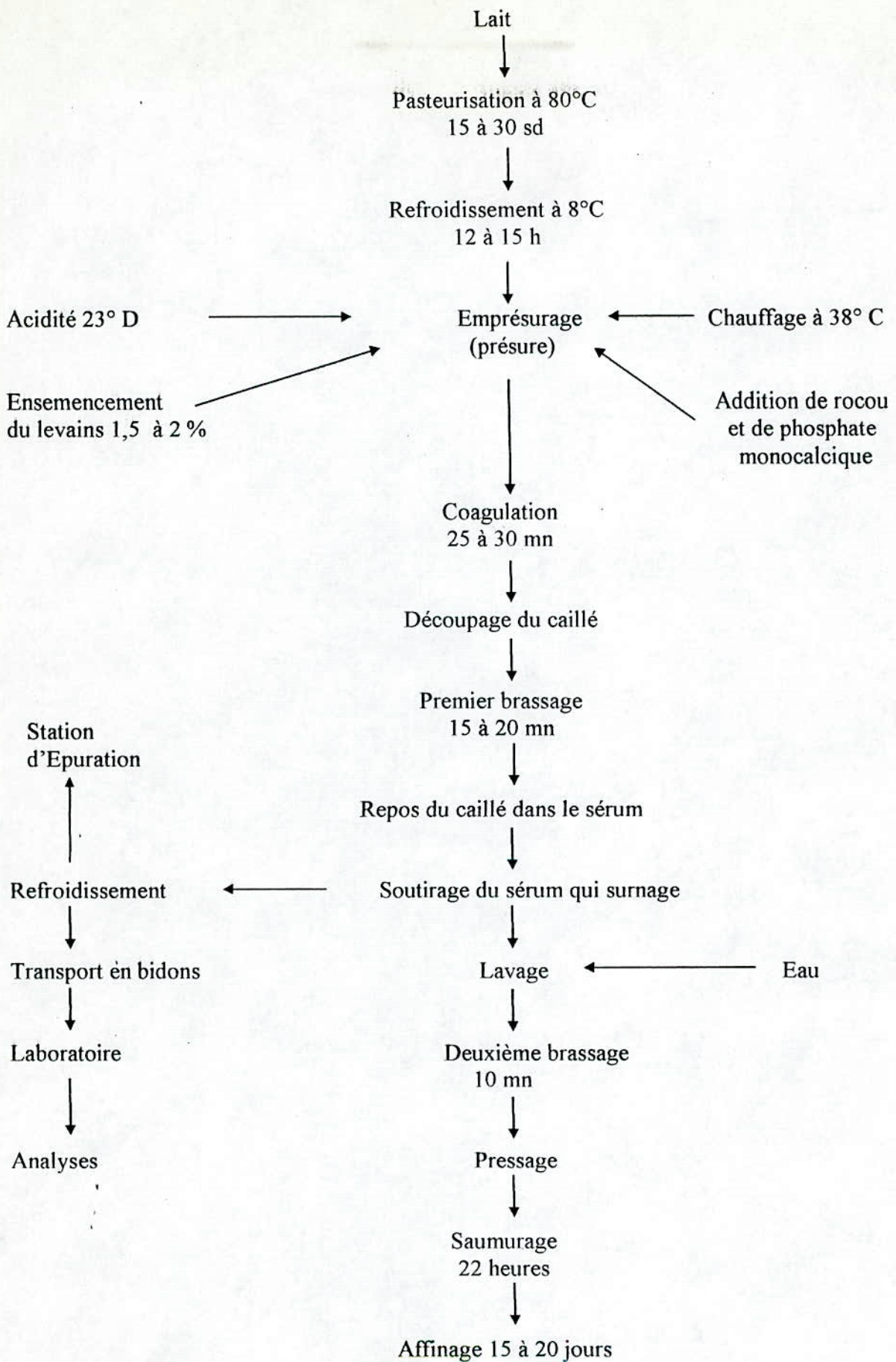
Les chlorures présents dans le lactosérum sont précipités sous forme de chlorure d'argent , puis titrée par du thiocyanate d'ammonium selon la méthode de Volhard (Afnor, 1986).

1.2.5. Dosage de l'Azote Total

L'azote total a été dosé selon la méthode de Kjeldahl. Le taux de protéines brutes est calculé en multipliant l'azote total par 6,25 (Afnor,1986).

1.2.6. Dosage de l'Azote non Protéique

L'azote non protéique est dosé par la méthode de Kjeldahl après précipitation des protéines par l'acide trichloroacétique 12 %.



**Fig. 2 : Processus de fabrication du fromage adapté à l'unité de Boudouaou
Origine du lactosérum**

1.2.7. Dosage du Lactose

La teneur du lactose a été déterminée par la méthode classique de Bertrand. Cette méthode est basée sur la réduction partielle d'un volume de liqueur cuproalcaline par le lactose contenu dans la prise d'essai. L'oxyde cuivreux formé est dosé par manganimétrie. Une table établie par l'auteur donne la correspondance entre la masse de cuivre précipitée sous forme d'oxyde de cuivre et la masse de lactose (mg) contenue dans la prise d'essai (Afnor, 1986).

1.2.8. Dosage et identification des acides gras composants la matière grasse du lactosérum

La teneur en matière grasse est déterminée selon la méthode de Gerber (Lecoq, 1965). L'analyse est basée sur la séparation de la matière grasse du lactosérum par centrifugation dans un butyromètre, après attaque des éléments du lactosérum - matière grasse exceptée - par l'acide sulfurique. Les acides gras obtenus sont analysés par chromatographie en phase gazeuse après estérification de la matière grasse selon la méthode de Wolff (1968).

1.2.9. Dosage des éléments minéraux

Le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium et le phosphore (Na, K, Ca, Mg, P) sont déterminés par spectroscopie d'absorption atomique (Duche *et al*, 1992).

La mesure de l'absorption se fait en utilisant une flamme oxydante air acétylène aux longueurs d'ondes ci-après : Ca/422,7 nm, K/766,5 nm, Mg/285,2 nm, Na/589,0 nm, P/213,6 nm.

Pour chaque élément à doser une gamme de solutions étalons est préparée. Les résultats sont exprimés en mg/l de lactosérum.

1.3. Analyse microbiologique du lactosérum frais

Le lactosérum, de par sa composition, est une matière première très facilement altérable.

La recherche de certains germes spécifiques des produits laitiers permet d'estimer la qualité hygiénique du lactosérum (Petranxiene et Lapied, 1981).

1.3.1. Détermination de la flore totale

Les micro-organismes aérobies et anaérobies facultatifs sont incubés à 30 °C sur un milieu gélosé non sélectif, pendant 48 heures. Le comptage des colonies se fait à l'œil nu. Les résultats sont exprimés en nombre de colonies par millilitre de lactosérum.

1.3.2. Recherche et dénombrement des coliformes

Les bactéries coliformes appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*, leur présence dans un milieu, indique une contamination d'origine fécale. Ces bactéries fermentent à 37 °C, après

48 heures d'incubation, le lactose avec dégagement de gaz dans un bouillon lactosé bilié au vert brillant. Le dégagement gazeux est perçu dans la cloche de Durham.

L'appréciation du nombre de germes dans les tubes se fait en utilisant le nombre le plus probable (NPP), en se référant à la table de Mac Grady (annexe).

1.3.3. Identification présomptive d'*Escherichia coli*

Le test d'Eijkman modifié par Mackenzie permet la détection présomptive d'*Escherichia coli*, qui après 48 heures d'incubation à 44 °C, fermente le lactose en produisant du gaz et de l'indole. Ces deux caractéristiques sont observées après le repiquage sur bouillon lactosé au vert brillant et sur eau peptonée d'une culture de coliformes positive.

Leur dénombrement se fait par la méthode du NPP.

1.3.4. Recherche et dénombrement des levures et des moisissures

Ce sont des champignons inférieurs qui prolifèrent sur des produits acides, en dégageant une odeur désagréable. L'OGA ou gélose à l'oxytétracycline est utilisée pour la recherche des levures et des moisissures. L'ensemencement se fait en surface et l'incubation à 22 °C pendant 5 jours. Les levures apparaissent opaques de forme convexe ou plate. Les moisissures apparaissent sous un aspect velouté. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par millilitre de lactosérum.

1.3.5. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes

Leur présence peut déterminer de graves intoxications alimentaires en particulier chez le nourrisson.

La recherche des staphylocoques est basée sur l'emploi de deux milieux sélectifs:

- milieu d'enrichissement : bouillon de Giolitti et Cantoni.
- milieu d'isolement : gélose de Chapman ou gélose de Baird Parker.

Les tubes et les boîtes ensemencés, sont incubés à 37 °C pendant 48 heures.

Les tubes présentant une couleur noirâtre sur bouillon GC sont soumis au test confirmatif de Chapman.

La présence de staphylocoques se manifeste par l'apparition de colonies convexes, jaunes - oranges à contour régulier. Après dénombrement, les résultats sont exprimés en nombre de germes par millilitre de lactosérum.

1.3.6. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux

La recherche des streptocoques fécaux se base sur l'utilisation également de deux milieux sélectifs:

- milieu de Rhothe dit de présomption.
- milieu de Litsky dit de confirmation.

Les tubes présentant un trouble sur le milieu de Rothe sont repiqués avec une anse bouclée sur des tubes du milieu de Litsky. Après 48 heures d'incubation, la présence de streptocoques fécaux se manifeste par un trouble avec ou sans dépôt de couleur violette. La quantification des résultats se fait par la méthode du NPP.

1.3.7. Recherche et dénombrement des clostridium sulfitoréducteurs

Ces germes responsables des toxi-infections alimentaires font partie de la famille des *Bacillaceae*.

Les clostridium se développent sur un milieu viande - foie contenant du sulfate de sodium et de l'alun de fer. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 48 heures.

Les clostridium sulfitoréducteurs apparaissent sous forme de colonies noires. Les résultats sont exprimés en nombre de spores par millilitre de lactosérum.

1.4. Etude de l'évolution de l'acidité du lactosérum conservé à température ambiante et à 4°C

Afin de déterminer l'aptitude du lactosérum au stockage, nous avons comparé l'évolution de l'acidité du lactosérum au cours de la conservation à température ambiante (28 °C) et à 4° C.

2. ÉTUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LEVURE CANDIDA CURVATA

2.1. Classification

La levure *Candida curvata* appelée aussi *Apiotrichum curvatum* a été isolée pour la première fois en 1977 par Moon et Hammond à partir d'une plante grasse. Cette levure a été recherchée pour sa capacité à utiliser le lactose et ses potentialités de production de lipides (Brown *et al.*, 1989) et de protéines (Agnes, 1986; Kallel, 1993). Sa place dans la classification est indiquée par la figure 3.

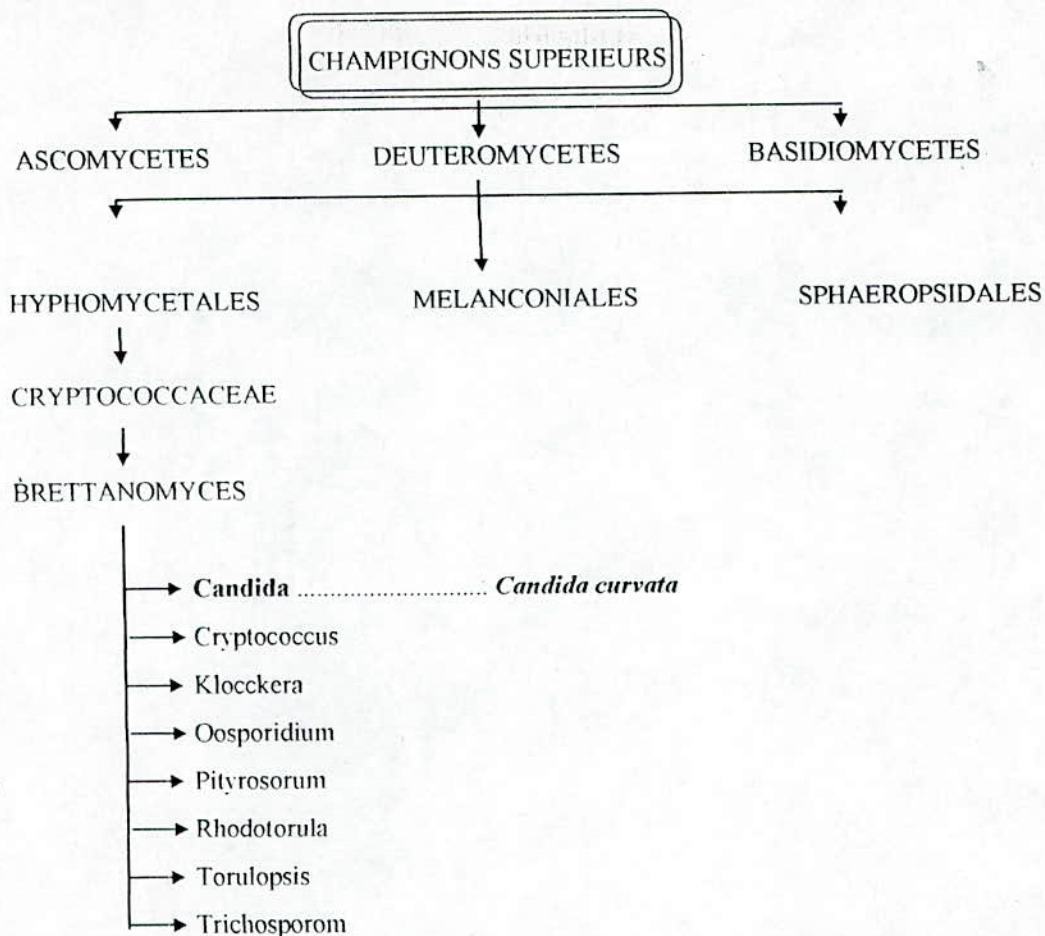


Fig. 3 : Place de la Levure *Candida curvata* dans la classification des levures
(Bouix et Leveau, 1980)

2.2. Origine de la souche

La levure utilisée pour cette étude est une souche de *Candida curvata* CBS 570, provenant de la chaire de génétique et de microbiologie de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier (France). Actuellement les souches de levures sont conservées à + 4° C sur milieu gélosé incliné à l'Institut National Agronomique d'El Harrach. Des repiquages sont effectués, tous les deux mois pour permettre aux levures de maintenir leur vitalité. Le milieu de conservation est à base de glucose (2 %) et d'extrait de levure (1 %).

2.3. Etude des caractéristiques morphologiques de *Candida curvata*

2.3.1. Présentation des colonies sur milieu solide

Les cultures sont effectuées sur milieu solide de sabouraud. L'ensemencement se fait par stries sur boîte de pétri. La lecture permet d'observer la taille des colonies, leur forme et leur aspect.

2.3.2. Observation microscopique de la cellule végétative

L'examen au microscope optique permet de distinguer la forme des cellules, leur mode de division ainsi que la présence éventuelle d'un pseudomycélium ou d'un mycélium vrai.

2.4. Etude des caractéristiques physiologiques de *Candida curvata*

Les principaux critères physiologiques étudiés reposent sur la fermentation des sucres et l'assimilation des composés carbonés et azotés.

2.4.1. Test de fermentation et d'assimilation des substrats carbonés

Le glucose, le saccharose, le maltose et le lactose sont conditionnés séparément dans des ampoules stériles à une concentration de 20 %, auxquels on ajoute :

- le milieu Wickerman, utilisé pour le test de fermentation des sucres qui se manifeste par un dégagement gazeux dans les tubes contenant la cloche de Durham après incubation.
- le milieu auxanogramme solide, utilisé pour le test d'assimilation des substrats carbonés, comme source d'énergie, se traduit par le développement des levures autour de disques imprégnés de la solution de sucre à tester, après incubation.

2.4.2. Test d'assimilation des composés azotés

L'utilisation de l'extrait de levures et du sulfate d'ammonium a été testée séparément sur milieu liquide de sabouraud. Un trouble est observé au fond des tubes après incubation à 28°C pendant 05 jours. Le milieu auxanogramme solide utilisé pour le test d'assimilation des nitrates se traduit par le développement des levures autour des dépôts de nitrates sur boîtes de Pétri.

3. ETUDE DE LA CINÉTIQUE DE CROISSANCE DE CANDIDA CURVATA EN VUE DE LA PRODUCTION DE LACTOPROTEINES LEVUREES

Une comparaison de deux cinétiques, en discontinu de *C. curvata* sur lactosérum brut et sur lactosérum déprotéiné permettra de préciser le comportement de cette souche vis-à-vis de la flore endogène en milieu non stérilisé et de calculer le rendement en biomasse en présence et en absence des lactoprotéines sériques. Le protocole expérimental envisagé pour la production de protéines levures et de lactoprotéines levurées à partir du lactosérum doux est indiqué par la figure 4.

3.1. Déprotéinisation du lactosérum

A un pH égal à 4,6, les protéines du lactosérum précipitent après chauffage à 100°C pendant 20 min.

Le lactosérum récupéré après filtration est suppléé en facteurs nutritionnels puis stérilisé dans un autoclave.

3.2. Supplémentation du lactosérum en facteurs nutritionnels

La nature et la quantité des apports nutritionnels ont été déterminés selon des données bibliographiques. Ainsi, une concentration en sulfate d'ammonium $[(NH_4)_2SO_4]$ de 0,5 % a été retenue (Nour elDien;1982). Les facteurs de croissance (acides aminés, vitamines) sont ajoutés sous forme d'extrait de levures (yeast extract difco) à raison de 0,1 % (Castillo et Sanchez, 1978). Enfin une solution d'oligo-éléments (qsp 1 litre) préconisés par Bayer (1981) contenant du $Cu SO_4$ (0,3 g) ; $Mn SO_4 \cdot H_2O$ (0,8 g) ; $Na_2 MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,4 g) ; $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$ (3,0 g) ; $Fe Cl_3 \cdot 6H_2O$ (4,0 g) est ajoutée au milieu de fermentation à raison de 1 ml/l de milieu.

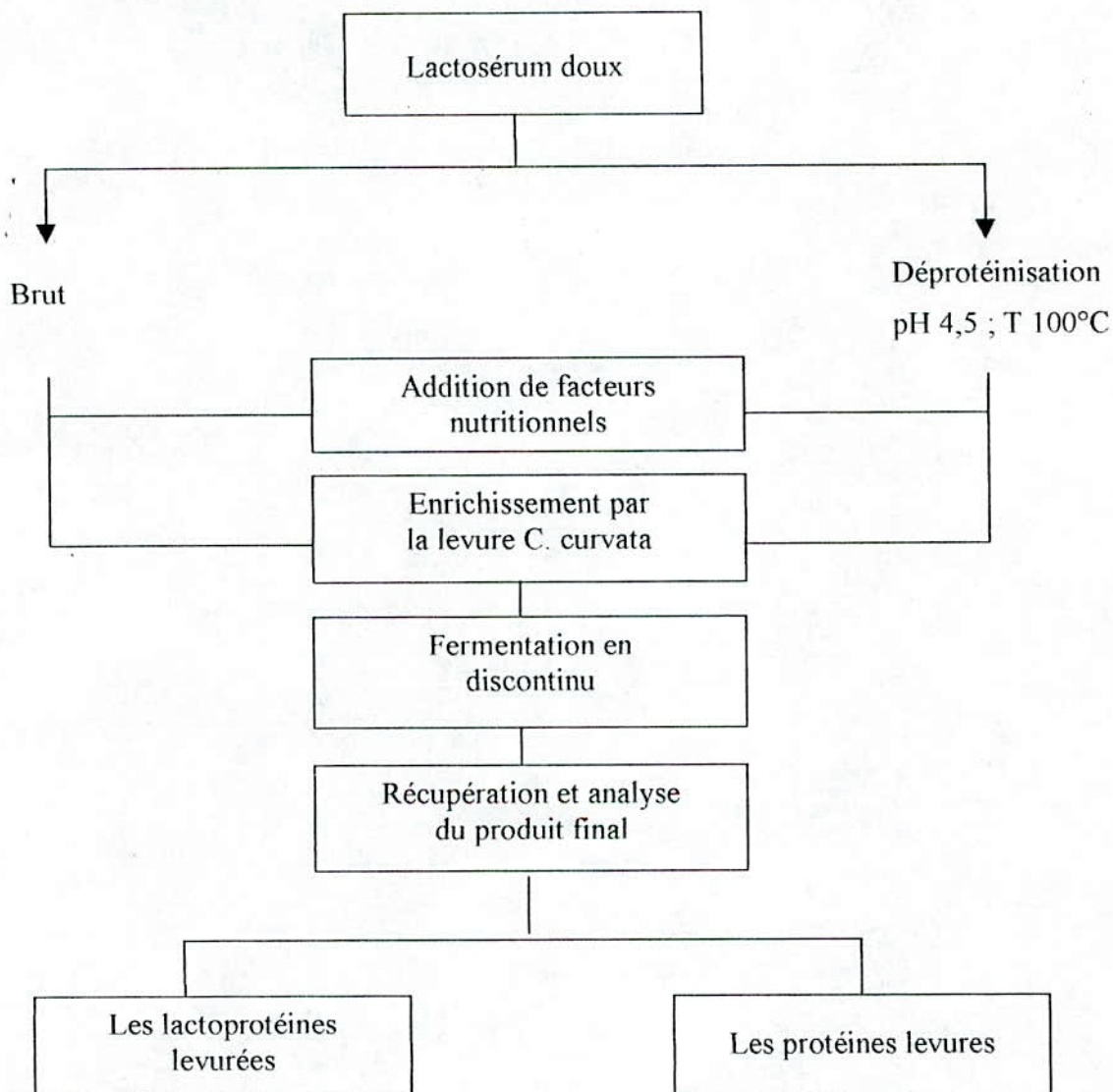


Fig. 4 : Protocol expérimental suivi pour la production de protéines levures et de lactoprotéines levurées à partir de lactosérum doux

3.3. Conduite de la fermentation

3.3.1. Préculture

Les précultures sont conduites dans des fioles d'Erlen Meyer d'une capacité de 200 ml contenant 20 ml du milieu de culture. Le milieu estensemencé avec une anse d'une culture jeune de *Candida curvata* obtenue sur gélose sabouraud. Les précultures sont incubées à 30 °C sous agitation magnétique, pendant 24 heures. Ces précultures serviront d'inoculum pour les essais de fermentation.

3.3.2. Choix du pH de culture

Puisque la pasteurisation du lactosérum brut non déprotéiné n'est pas envisagée, le pH doit être suffisamment bas afin, d'une part de favoriser le développement des levures, micro-organismes acidophiles, et d'autre part de limiter celui des bactéries indésirables. Le pH de 4,5 préconisé par Agnes (1986) a été retenu. Cependant différentes valeurs de pH ont été testées.

3.3.3. Choix de la température de croissance

Pour déterminer la température optimale de croissance de la souche dans des conditions expérimentales, nous avons testé un intervalle de température de 25°C, 30°C et 35°C.

3.3.4. Culture en fioles d'Erlen Meyer

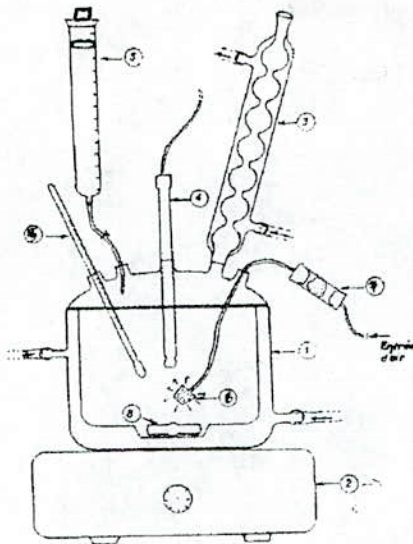
Avant chaque fermentation, on vérifie la pureté de la préculture par observation microscopique. Des fioles d'un litre remplies au dixième de leur volume du milieu de culture sont placées sous agitation magnétique dans un bain thermostaté. L'incubation dure 24 à 48 heures.

3.3.5. Culture en minifermuteur

Les cultures en fermenteur ont été conduites pour une production de biomasse suffisante. Elles sontensemencées stérilement avec des précultures de 24 à 48 heures. Pour cela nous avons conçu un fermenteur de 2 litres dont le dispositif est représenté sur la figure 5.

Les conditions de culture en fermenteur sont celles préconisés par Agnes (1986). Les cultures sont conduites à 30 °C sous une agitation de 720 tr/mn. L'aération est assurée par injection d'air stérile avec un débit de 1,6.V.V.m.

Le pH initial de 4,5 est non régulé. Afin d'éviter la formation de mousse, on ajoute quelques gouttes d'antimousse (polyéthylène glycol) dans le milieu de fermentation (Moon *et al*, 1978).



- (1) Fermenteur,
- (2) Agitateur magnétique,
- (3) Réfrigérant,
- (4) Electrode de pH,
- (5) Thermomètre,
- (6) Diffuseur d'air,
- (7) Filtre à air,
- (8) Barreau magnétique,
- (9) Seringue.

Fig 5 : Montage expérimental mis au point pour la production de la biomasse cellulaire

3.4. Suivi de la fermentation

3.4.1. Mesure de la croissance

La croissance de la levure est évaluée par deux méthodes :

- **La Turbidimétrie** : consiste à mesurer l'absorbance (550 nm) de la suspension de levures à différentes phases de la croissance avec un spectrophotomètre UV/Vis type Perkin Elmer (Glatz *et al.*, 1984).
- **Le poids Cellulaire** : consiste à centrifuger à 7000 tr/mn, un volume de 10 ml d'une suspension de levures pendant 10 mn. Le culot obtenu est lavé deux fois à l'eau distillée. Les cellules de levures ainsi récupérées sont portées à dessiccation à 100°C. Le poids cellulaire sec est déterminé après obtention d'un poids constant (Kallel, 1993).

3.4.2. Calcul des paramètres de croissance

- **La phase de latence** est déterminée graphiquement à partir de la courbe de croissance.
- **Le taux de croissance** est directement proportionnel à la variation de la concentration cellulaire (Log N) en fonction du temps.

3.4.3. Dosage du lactose résiduel

Le sucre résiduel du milieu de culture est dosé par la méthode usuelle au phénol sulfurique (Dubois *et al.*, 1956).

3.4.4. Dosage de l'éthanol

L'éthanol produit par fermentation est dosé par chromatographie en phase gazeuse .

Conditions opératoires :

- température de l'injecteur 150° C
- température du détecteur 200° C
- température de la colonne 130° C
- débit du gaz vecteur (hélium) 25 ml/mn
- nature de la colonne nickel

3.4.5. Rendement en biomasse

Le rendement $Y_{x/s}$ est défini comme étant le rapport entre la quantité de biomasse formée et la quantité de sucre consommée.

$$\text{Rendement } Y_{x/s} = \frac{\text{quantité de biomasse formée}}{\text{quantité de sucre consommé}} \times 100$$

4. RECUPERATION ET ANALYSE DU PRODUIT FINAL.

4.1. Analyse bactériologique

L'analyse a été orientée vers la recherche et le dénombrement, des germes totaux, des coliformes ,des staphylocoques ,des streptocoques et des moisissures (**Pétranxiène et Lapidé, 1981**).

4.2. Récupération de la biomasse

A la fin de la fermentation en phase stationnaire, la culture est centrifugée pendant 15 mn. Le culot recueilli est lavé deux fois à l'eau distillée puis séché à l'étuve. La poudre de levures obtenue servira pour les différentes analyses biochimiques.

4.3. Analyse biochimique

4.3.1. Détermination de la teneur en acides nucléiques

Les acides nucléiques totaux présents dans la biomasse cellulaire ont été dosés par extraction à l'acide perchlorique (**Levine et Cooney, 1973**). Deux millilitres d'une suspension de levures, sont centrifugés pendant 15 minutes puis lavés à l'eau distillée. Le surnageant contenant les acides nucléiques est conservé après trois extractions successives de la suspension dans 5 ml d'acide perchlorique (0,5 N) à 70 °C pendant 10 mn. Les trois surnageants sont mélangés et leur absorption est mesurée au spectrophotomètre à 240 nm. La teneur en acides nucléiques est calculée en prenant un coefficient d'extinction de 32 pour une solution contenant 1 gramme par litre d'acide nucléique.

4.3.2.. Extraction et dosage des lipides totaux

Les méthodes d'extraction des lipides microbiens sont basées sur des extractions séquentielles nécessitant l'utilisation de divers solvants organiques.

La méthode utilisant le méthanol et le benzène préconisée par **Sobus et Holmlund (1976)** est la plus utilisée. (fig 6).

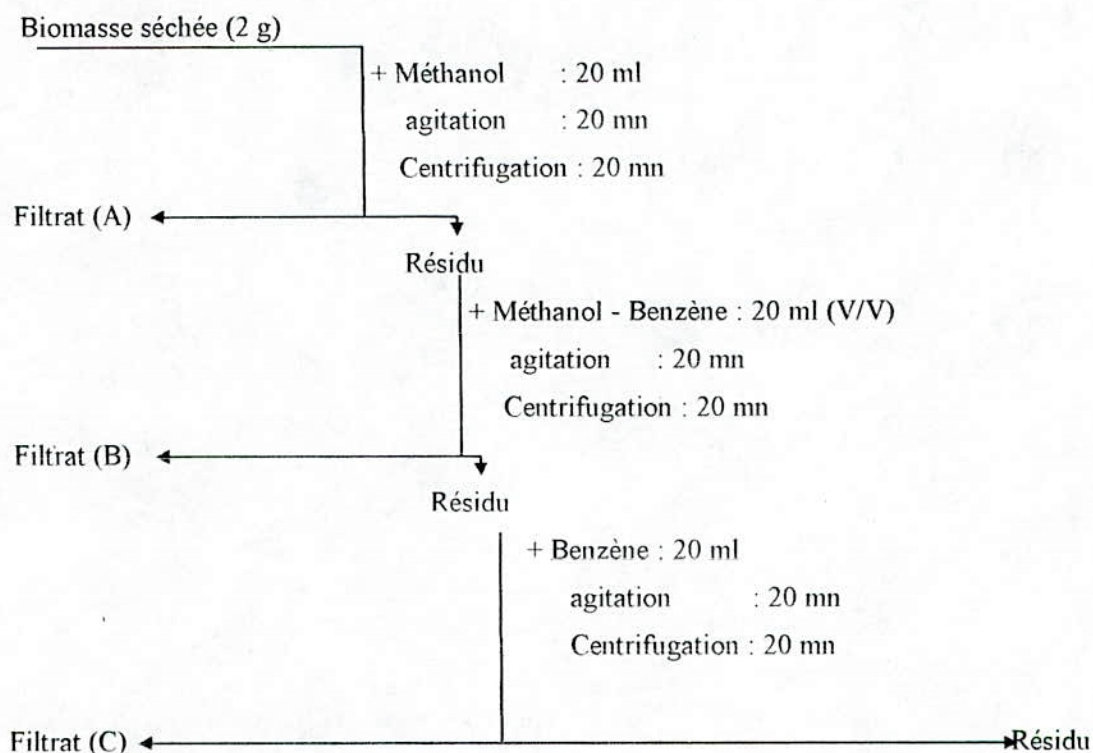


Fig. 6 : Les différentes étapes de l'extraction des lipides de *Candida curvata* (Sobus et Holmlund 1976)

Les filtres (A), (B) et (C) sont récupérés dans un ballon rodé de 250 ml, les solvants sont évaporés à 65 °C. Les lipides restants sont rincés trois fois avec le chloroforme et transvasés dans une ampoule à décanter dans laquelle on ajoute 100 ml d'une solution saturée de NaCl. Après une forte agitation, on laisse décanter 6 heures environ. La phase inférieure (phase organique) est récupérée dans un ballon rodé de 100 ml, le chloroforme est évaporé à 65 °C. Le ballon est ensuite placé dans une étuve à 60 °C jusqu'à obtention d'un poids constant.

4.3.3. Dosage des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Les acides gras de la fraction lipidique obtenue sont méthylés selon la méthode de **Wolff (1968)**. L'analyse chromatographique des esters méthyliques est réalisée à l'aide d'un appareil type

PYUNICAM 4500 avec un détecteur à ionisation à flamme. La séparation a été effectuée dans une colonne garnie de DEGS 20 % (diéthylène glycolsuccinate) dans les conditions suivantes:

Longueur de la colonne	1,5 m
Température de la colonne	180 °C
Température du détecteur	280 °C
Température de l'injecteur	240 °C
Quantité injectée	0,2 µl
Débit du gaz vecteur (Azote)	25 ml/mn

L'identification des acides gras a été réalisée à l'aide des esters méthyliques d'acides gras standards.

4.3.4. Dosage des protéines

La teneur en protéines de la biomasse a été estimée à partir de l'azote total, calculé selon la méthode de Kjeldahl.

4.3.5. Dosage des acides aminés par chromatographie liquide haute performance

L'analyse des acides aminés est effectuée par chromatographie liquide haute performance après hydrolyse des protéines selon la méthode de **Moore et Stein (1963)**. L'acide chlorhydrique 6 N est utilisé pour l'hydrolyse des protéines sous reflux pendant 24 heures, à une température de 110 °C.

Les acides aminés obtenus sont lavés puis filtrer. Le filtrat est conservé jusqu'à l'analyse chromatographique selon **Cohen et al (1993)**.

Les protéines du lactosérum sont précipités par l'acide trichloracétique 12 %, séparées par centrifugation, puis récupérées pour être hydrolyser selon le même procédé.

4.3.6. Dosage de la vitamine E

Après saponification d'une prise d'essai de la biomasse, avec une solution d'hydroxyde de potassium en milieu éthanolique et extraction à l'éther de pétrole, les extraits sont purifiés par lavage à l'acide sulfurique. La vitamine E sous forme d' α -tocophérols est dosée par chromatographie liquide haute performance

- Conditions opératoires

Détecteur UV/Visible	$\lambda=292$ nm
Phase mobile	hexane-propanole (99/1)
Gaz vecteur (Azote)	1 ml/mn
Volume injecté	25 µl.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

1. VALEUR ALIMENTAIRE DU LACTOSÉRUM

1.1. Composition biochimique du lactosérum de Boudouaou

La coagulation du lait par la présure, suivie d'un égouttage du caillé conduit à un sérum doux (acidité égale à 14°D) riche en éléments nutritifs.

Les résultats des différentes analyses sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5: Composition biochimique moyenne du lactosérum issu de la laiterie de Boudouaou

Composants	Teneur en g/l	MS (%)
Matière sèche	73,72	-
Lactose	48,58	65,89
Protéines (N x 6,25)	9,17	12,43
Azote non protéique	0,66	0,89
Matière grasse	1,50	2,10
Matière minérale	6,60	8,95

- Les valeurs indiquées représentent la moyenne de 3 essais pour chaque analyse.

Les valeurs obtenues mettent en évidence une teneur importante en matière sèche (73,72 g/l) dont le constituant principal est le lactose (65,89 %).

Notons toutefois que la teneur en matière sèche, comme celle des autres constituants varie selon l'origine du lactosérum et le procédé d'obtention (**Sottiez, 1985**).

La teneur en lactose (48,58g/l) constitue pour la flore de la panse bovine un apport important de lactose, sucre rapidement fermentescible en acide lactique utilisé pour le métabolisme des acides gras (**Morel et Girard, 1984**).

Rappelons que le lactosérum trouve de nombreuses applications dans le domaine de la production animale et notamment dans l'élevage bovin.

D'après **Adrian (1981)**, 11 % du lactose se trouve lié aux protéines. Les matières azotées totales du lactosérum représentent par rapport à la matière sèche 12,43 % de protéines et 0,89 % d'azote uréique, ammoniacal et nucléique.

Les protéines du lactosérum sont considérées comme des protéines de haute valeur nutritionnelle (**Alais, 1981**).

1.1.1. Composition en acides aminés des protéines du lactosérum

L'analyse chromatographique par HPLC des protéines sériques a révélé l'aminogramme indiqué par le tableau 6.

Tableau 6: Composition moyenne en acides aminés des protéines du lactosérum doux de Boudouaou

Acides aminés	Teneur en g/100 g protéines
A. aspartique	1,15
Sérine	2,5
Glutamate	1
Glycine	1,43
Histidine	2,5
Arginine	6,41
Théonine	2,58
Alanine	0,91
Proline	1,35
Cystéine	1,66
Tyrosine	5
Valine	3,25
Méthionine	1,56
Lysine	10,16
Isoleucine	5,33
Leucine	1,75
Phénylalanine	1,25
Tryptophane	1,50

▪ Les résultats indiqués représentent la moyenne de trois essais.

Le profil chromatographique montre que la composition des protéines du lactosérum se distingue particulièrement par la présence des huit acides aminés essentiels dont la lysine, la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la valine, la thréonine, et le tryptophane. Ce qui leur confèrent selon **Forsum (1977)** une valeur biologique exceptionnelle sachant que la méthionine et la lysine sont les principaux facteurs limitants, de beaucoup d'aliments (**Alais, 1981**).

L'acide aspartique, le glutamate, la glycine, l'alanine et la proline sont aussi présents. Notons cependant que l'hydrolyse acide provoque une faible destruction de certains acides aminés tels que la cystéine, la sérine, la théonine et l'arginine.

1.1.2. Composition en acide gras des lipides du lactosérum

Le découpage du caillé lors de l'égouttage favorise le passage dans le sérum d'une partie de la matière grasse emprisonnée dans le coagulum. Le plus souvent dans les traitements industriels le

lactosérum est écrémé et la matière grasse récupérée est utilisée dans la fabrication d'un beurre de second choix (Evette, 1975).

Le lactosérum de Boudouaou contient 1,5 g/l de matière grasse, et ne subit pas d'écrémage avant son rejet dans la nature.

Le profil en acides gras des lipides du lactosérum, issu du lait pasteurisé, révèle la présence d'acides gras saturés et insaturés. (Tab. 7). Selon Montreuil (1971) la composition de matière grasse du lactosérum est analogue à celle du lait d'origine.

Tableau 7: Identification et teneurs des acides gras du lactosérum de Boudouaou

Acides gras (%)		Lactosérum	Lait de vache
Acide butyrique	C4 : 0	2,30	3,60
Acide caproïque	C6 : 0	1,58	2,05
Acide laurique	C12 : 0	5,28	4,75
Acide myristique	C14 : 0	4,06	11,25
	C14 : 1	6,59	
Acide palmitique	C16 : 0	20,86	27,1
Acide palmitoléique	C16 : 1		
Acide stéarique	C18 : 0	5,04	8,02
Acide oléique	C18 : 1	12,93	25,05
Acide linoléique	C18 : 2	1,00	1,65
Acide linoléique	C18 : 3	1,60	2,15

- Les résultats indiqués représentent la moyenne de trois essais

L'analyse des acides gras polyinsaturés permet de mettre en évidence la présence de deux acides gras essentiels: linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3). Ces deux acides présentent un grand intérêt thérapeutique (Youyou, 1986).

1.1.3. Composition de la matière minérale du lactosérum

La matière minérale du lactosérum représente 8,95 % de la matière sèche et se compose essentiellement de potassium, de calcium, de sodium, de magnésium, de phosphore et de sels de chlorures. Notons cependant que le lactosérum doux de l'unité de Boudouaou est déficient en phosphore. La carence en phosphore dans une ration alimentaire entraîne chez les animaux une diminution de la consommation d'aliments et un retard de la croissance.

Les résultats des teneurs des différents minéraux sont notés dans le tableau 8.

Tableau 8: Teneur en principaux minéraux du lactosérum de Boudouaou

Eléments minéraux	Teneur en g/l	Fevrier et Toullec, 1981
Sodium	0,344	0,4 – 0,6
Potassium	1,57	1,3 – 2,0
Calcium	1,25	0,5 – 1,3
Magnésium	0,11	0,08–0,16
Phosphore	0,093	0,4 – 0,6
Chlorures	2,04	2,1 – 2,7

- Les valeurs indiquées représentent la moyenne de 3 essais pour chaque analyse.

D'après **Morel et Girard (1984)** les teneurs moyennes en minéraux du lactosérum utilisé en alimentation animale sont suffisantes pour couvrir les besoins des bovins en particulier celui des vaches laitières.

Ces minéraux jouent un rôle dans la constitution du squelette de l'animal, dans l'élaboration des diastases et des hormones, dans la production du lait, des œufs et de la viande.

Cependant il est conseillé de mettre à la disposition des animaux des pierres à sels enrichies en minéraux.

La teneur des nutriments qui composent le lactosérum ayant été déterminée, leurs rôles dans l'organisme lui confèrent son exceptionnelle qualité nutritionnelle.

1.2. Qualité hygiénique du lactosérum de Boudouaou

La valorisation possible du sérum brut est directement liée à sa qualité hygiénique au moment de la collecte et aux conditions de conservation nécessaires à la préservation de cette qualité.

Les résultats de l'analyse microbiologique du lactosérum de Boudouaou sont regroupés dans le tableau 9.

Tableau 9: Analyse microbiologique du lactosérum de Boudouaou

Micro-organismes recherchés (germes/ml)	Lactosérum
Germes totaux	2500
Coliformes	150
<i>Echerichia coli</i>	abs
Streptocoques	abs
Staphylocoques	abs
Clostridium	abs
Levures	35
Moisissures	50

- Les résultats indiqués représentent la moyenne de 3 dilutions pour chaque germe recherché.

Les connaissances bactériologiques actuelles portent essentiellement sur le lait de vache compte tenu de son importance économique au niveau mondial. Or d'autres productions de moindre importance mais de grand intérêt méritent d'être étudiées plus. Pour notre étude, on ne peut se référer qu'aux critères microbiologiques proposés pour le lait cru par le Ministère du commerce (J.O.R.A., 1998): Germes aérobies 30 °C ($10^5/ml$), Coliformes fécaux ($10^3/ml$), Streptocoques fécaux (0/0,1 ml), Clostridium sulfitoréducteurs (50/ml).

Le nombre élevé de germes totaux est dû en particulier à la présence de ferments lactiques ajoutés pour la coagulation du lait (1,5 à 2 %). Il faut noter, toutefois que ces ferments peuvent empêcher la prolifération des germes de contamination tels que les streptocoques, les staphylocoques et les clostridium (Dousset et Levesque, 1986).

Cependant, il est bien connu que l'acidification du milieu inhibe la croissance des bactéries notamment pathogènes. En effet, Fox et O'Connor (1969) ont montré que les germes les plus dangereux disparaissent sous l'effet de l'acidification du milieu.

La présence de coliformes dans le lactosérum est probablement due en général à un nettoyage défectueux des bacs, ou à l'emploi d'une eau de rinçage contaminée.

Les levures et moisissures font partie naturellement de la flore lactique. Néanmoins leur présence est peu souhaitable. Certaines moisissures peuvent synthétiser de redoutables toxines (O.N.L., 1982).

1.3. Effet de la réfrigération sur la conservation du lactosérum

Afin de déterminer l'aptitude du lactosérum à un éventuel stockage (dans le cas où son utilisation ne peut-être immédiate), nous avons mesuré l'évolution de son acidité en fonction du temps de stockage.

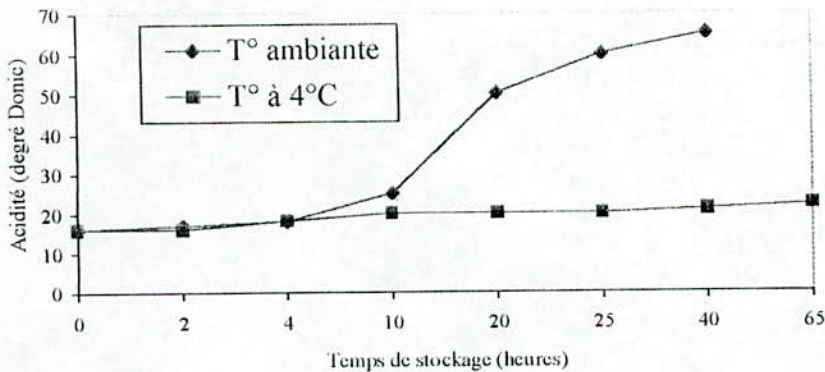


Fig. 7: Evolution de l'acidité du lactosérum conservé à 4°C et à une température ambiante (28°C)

Il paraît clairement à partir de la figure 7 qu'un sérum stocké à 4 °C se conserve mieux que celui qui reste à température ambiante. L'intérêt de la réfrigération est de limiter le développement des bactéries. Cependant, certaines bactéries psychrotrophes continuent à se développer en produisant des enzymes protéolytiques dont l'activité est optimale à 30°C (Dousset et Levesque, 1986).

Lors de ces travaux sur la conservation du lactosérum par le froid, Février (1977) avait montré qu'une acidité élevée (supérieure à 50 °D) entraînait une perte de matière sèche qui pourrait atteindre 25 % de sa quantité initiale. Cette perte est plus importante dans le sérum doux que dans le sérum acide. L'élévation de l'acidité entraîne également la diminution du taux de lactose dans le lactosérum (Zodow, 1984; Sottiez, 1985).

Pour le stockage du lactosérum, il est conseillé d'utiliser des matériaux en acier inoxydable ou en matière plastique (Morel et Girard, 1984).

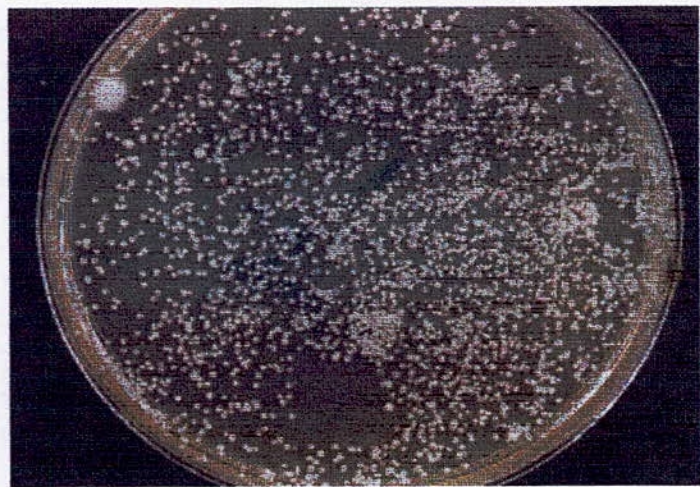
Ces derniers doivent être équipés d'agitateurs à vitesse lente, pour maintenir la masse en mouvement et éviter les dépôts de lactose (Montreuil, 1971).

2. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LEVURE *CANDIDA CURVATA*

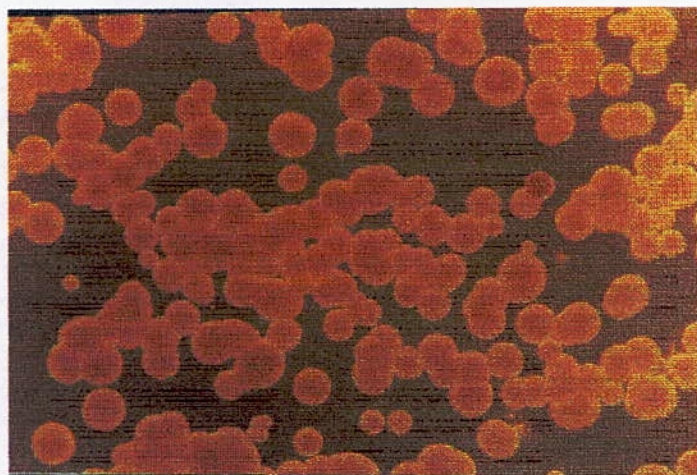
2.1. Caractéristiques morphologiques

La levure *Candida curvata* apparaît après trois jours de culture sur milieu sabouraud sous forme de petites colonies de couleur crème, lisses, bombées, à contour régulier (Pl. 1). Une observation au microscope optique montre que les cellules sont sous forme allongée mais le plus souvent sphérique (Pl. 2,a).

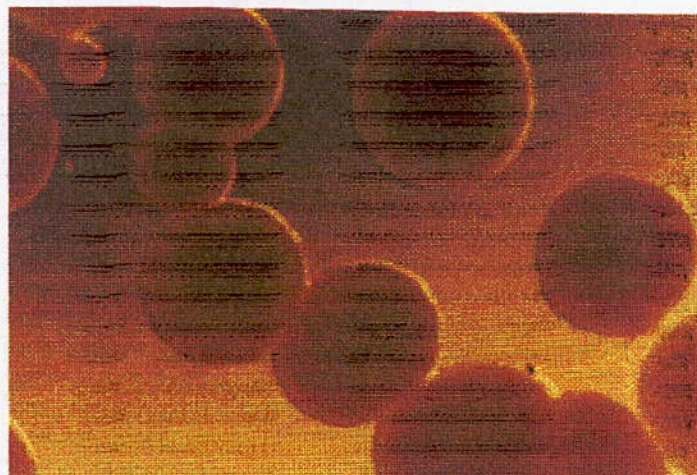
Les parties visibles de leur structure sont la paroi cellulaire, le cytoplasme, les vacuoles, les granules de réserves et le noyau.



(a)



(b)



(c)

Planche 1 : Observation des colonies de *Candida curvata*

(a) sur boîte de Pétri

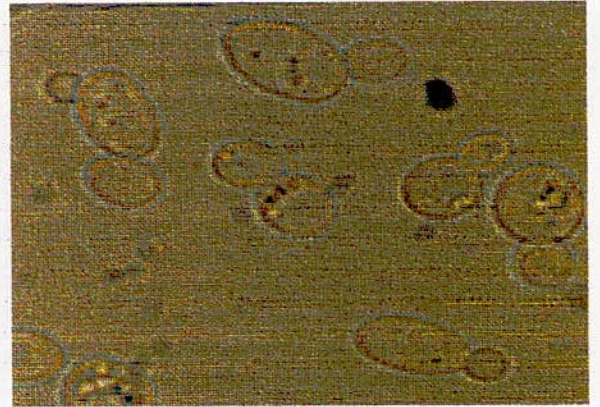
(b) au stéréomicroscope (Gr. x 9)

(c) au stéréomicroscope (Gr. x 50)

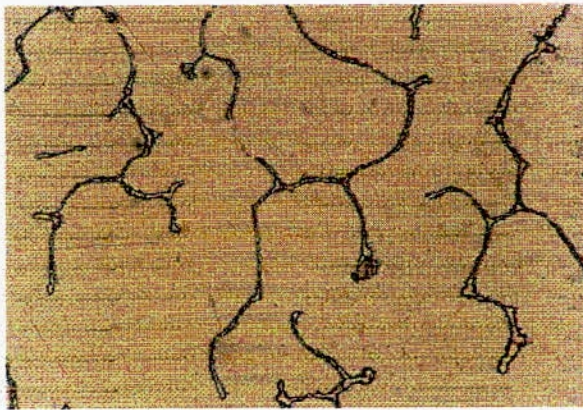
(a)



(b)



(c)



(d)

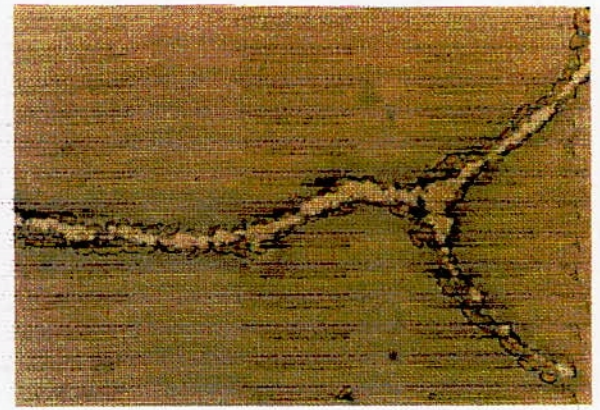


Planche 2 : Observations microscopiques

(a) des cellules de *Candida curvata* (100 x 3,2)

(b) des cellules de *C. curvata* en division (150 x 3,2)

(c) du pseudomycélium de *C. curvata* (10 x 3,2)

(d) du pseudomycélium de *C. curvata* (100 x 3,2)

Les vacuoles contiennent des enzymes hydrolytiques telles que les protéases, l'estérase, et les ribonucléases. En outre, ces vacuoles permettent une accumulation des purines utilisées comme source d'azote par les levures du genre *Candida* (Rose et Harrison, 1971).

On remarque que cette levure est dépourvue de flagelle. *Candida curvata* étant asporogène, son mode de division se fait par bourgeonnement multipolaire (Pl. 2,b).

La reproduction par bourgeonnement débute par la formation d'une petite invagination à un point de la surface de la cellule mère. La taille de la cellule reste constante pendant que le bourgeon augmente de taille pour se détacher et donner une nouvelle cellule en fin de production (Pl. 2,b). Les produits de divisions sont distribués entre les deux cellules. L'observation microscopique montre également que les cellules de *C. curvata* sont caractérisées par leur aptitude à former un pseudomycélium. Ces cellules restent attachées les unes aux autres pour constituer une forme de chaînettes : le pseudomycélium (Pl. 2,c,d) (Lodder, 1971 ; Larpent, 1985 ; Kritzman, 1990).

2.2. Caractéristiques physiologiques

Les résultats des tests de fermentation des composés sucrés et d'assimilation des composés carbonés et azotés sont regroupés dans le tableau 10.

Tableau 10: Résultats des tests d'assimilation et de fermentation des composés carbonés et azotés de *C. curvata*

Composés carbonés	Assimilation	Fermentation
Glucose	+	+
Galactose	+	+
Saccharose	+	+
Mélibiose	-	-
Maltose	-	-
Lactose	+	+
Composés azotés		
Nitrate de potassium	-	
Extrait de levures	+	
Sulfate d'ammonium	+	

Les levures du genre *Candida* dégradent les composés carbonés par métabolisme oxydatif. Cette voie métabolique est très énergétique et permet une multiplication cellulaire rapide. Les substrats carbonés sont également utilisés par voie fermentaire pour produire de l'éthanol et du gaz carbonique.

La multiplication cellulaire est moins importante que dans le cas du métabolisme oxydatif (**Bouix et Leveau , 1980**). *Candida curvata* métabolise en aérobiose les mêmes sucres qu'elle fermente en anaérobiose.

Cette levure est incapable d'assimiler les nitrates mais assimile facilement l'extrait de levures et le sulfate d'ammonium (**Lin et Feng, 1987**). Les levures utilisent les composés azotés pour la synthèse des protéines et des acides nucléiques (**Leveau et Bourgeois, 1980**).

3. UTILISATION DU LACTOSERUM BRUT POUR LA PRODUCTION DE LACTOPROTEINES LEVUREES

3.1. Cinétique de croissance comparée de *Candida curvata* sur lactosérums brut et déprotéiné

La croissance de la souche *Candida curvata* préalablement caractérisée, est étudiée simultanément sur lactosérums brut et déprotéiné suppléé par du sulfate d'ammonium, de l'extrait de levures et par une solution minérale.

Les différentes cultures sont réalisées en discontinu dans des fioles puis optimisées en minifermuteur. La croissance est suivie sur des culturesensemencées par des précultures de 24 heures (Densité optique égale à 2). Avant chaque culture, il est nécessaire de vérifier la pureté de la préculture au microscope optique. La croissance est évaluée par la méthode turbidimétrique et par la mesure de la matière sèche.

Le pH initialement de 4,5 est non régulé, la température est maintenue à 30 °C. Les Variations des paramètres de croissance et les rendements en biomasse de *C. curvata* en fonction de la présence et de l'absence des protéines sont déterminées à partir des courbes de la cinétique de croissance.

3.1.1. Paramètres de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum déprotéiné

La croissance de *C. curvata* sur le lactosérum déprotéiné a permis dans un premier temps d'étudier la cinétique de notre souche en culture pure (Fig. 8).

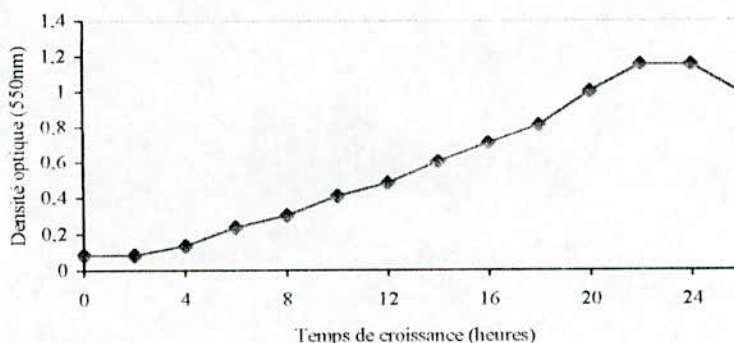


Fig. 8: Cinétique de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum déprotéiné

Suite à une phase de latence de 2 heures 30, la phase exponentielle s'installe et dure 20 heures, au cours de laquelle le taux de croissance atteint une valeur de $0,23 \text{ h}^{-1}$.

Le suivi de la culture de *C. curvata* en minifermuteur montre que la souche consomme la totalité du lactose initialement présent (46 g/l), uniquement par voie oxydative en produisant 8,56 g/l de biomasse (Fig. 9).

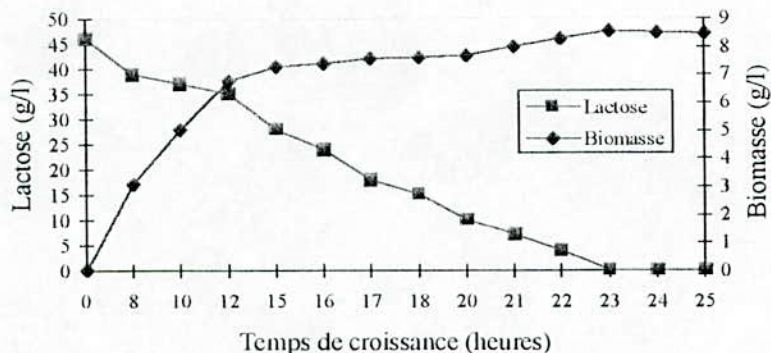


Fig. 9: Evolution de la biomasse et de la consommation du lactose au cours de la croissance de *C. curvata* en minifermuteur sur lactosérum déprotéiné.

La quantité de biomasse est maximum après 24 heures de culture et le rendement en biomasse est alors de l'ordre de 18,7 %. L'aération permet un bon transfert d'oxygène et évite le développement d'un métabolisme fermentaire. Cependant, la quantité d'éthanol produite en fin de culture est de 0,06 g/l.

L'activité des enzymes de la glycolyse est diminuée, il y a croissance des cellules avec production d'éthanol. Toutefois, il faut noter que ces expériences sont conduites dans de bonnes conditions d'aération. Donc l'apparition de la voie fermentaire ne peut s'expliquer que par l'augmentation de la concentration du lactose par répression catabolique et non par une limitation d'oxygène dissous.

Il est généralement connu que quelque soit le degré d'aération, et au-dessous d'une concentration en lactose dépassant un seuil limite, la production d'éthanol ne peut être évitée ce que l'on appelle effet crabtrée (Damiano *et al.*, 1985).

3.1.2. Paramètres de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut.

Les figures 10 et 11 montrent que *C. curvata* cultivée sur milieu à base de lactosérum brut, permet la production de 6,04 g/l de biomasse.

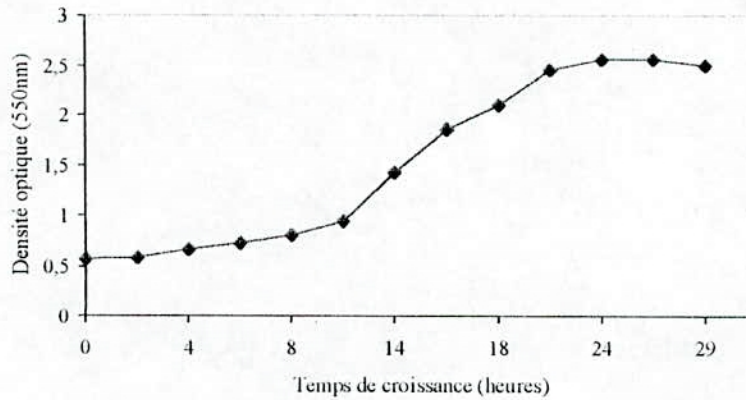


Fig. 10: Cinétique de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut.

La vitesse de croissance atteint une valeur de $0,13 \text{ h}^{-1}$. La phase de latence dure 3 heures. Le lactose n'est pas totalement métabolisé, le rendement en biomasse est de 14,38 %.

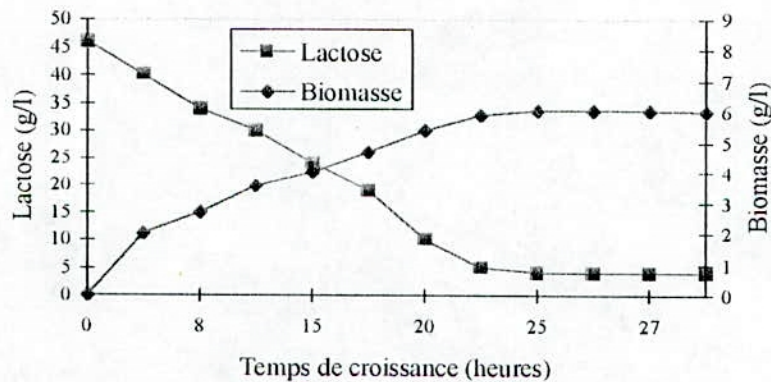


Fig. 11: Evolution de la biomasse et de la consommation du lactose au cours de la croissance de *C. curvata* en minifermenteur sur lactosérum brut.

En fin de fermentation, il y a apparition de $0,1 \text{ g/l}$ d'éthanol, au détriment de la production de la biomasse.

3.1.3. Conclusion

Les résultats obtenus relatifs aux paramètres de croissance concernant la culture de *C. curvata* sur les milieux brut et déprotéiné montrent que ceux-ci varient en fonction du milieu de culture.

On remarque qu'en absence de protéines dans le milieu de culture à base de lactosérum, la production de levures atteint $8,56 \text{ g/l}$ alors qu'en leur présence la biomasse n'est que de l'ordre de $6,04 \text{ g/l}$; les vitesses de croissances respectives sont de $0,23 \text{ h}^{-1}$ et $0,13 \text{ h}^{-1}$. La consommation du lactose est totale en milieu déprotéiné, alors qu'elle est de 91,31 % pour le lactosérum brut. Nous

supposons que cette variation s'explique par une meilleure utilisation du lactose en absence de protéines.

D'après **Moulin et al. (1981)** le procédé de fabrication des levures n'est pas accéléré par la présence de protéines, qui flocculent dans le milieu de culture quand la biomasse devient importante, provoquant ainsi la diminution du transfert d'oxygène dans les cellules. **Monus et Miniac (1985)** ont en effet mentionné qu'un mauvais transfert d'oxygène, dissout dans le milieu, entraîne chez les cellules de levures une dérivation du métabolisme oxydatif vers le fermentaire avec production d'éthanol. Ce-ci pourrait expliquer la différence des résultats comparés, et l'apparition d'une quantité plus importante d'éthanol dans le milieu brut.

Cependant, dans le cas de *C. tropicalis*, **Knopfel (1974)** avait montré que l'effet pasteur est insuffisant pour empêcher toute fermentation quel que soit l'apport en oxygène.

3.2. Optimisation du procédé en discontinu de la culture de *C. curvata* sur lactosérum brut.

3.2.1. Influence de la variation du pH sur la croissance de *C. curvata*.

Chaque micro-organisme exige pour sa croissance optimale un pH déterminé, pour cela plusieurs valeurs de pH ont été testées. D'après de la figure 12, l'allure des courbes obtenues pour les différentes valeurs de pH montre que pour une valeur de 4,5, le taux de croissance paraît le plus élevé ($0,13 \text{ h}^{-1}$) avec un rendement maximum de 14,38 %. Alors qu'aux pH 3 et 4, les taux de croissance et les rendements en biomasse respectifs ($0,10$ et $0,12 \text{ h}^{-1}$), (12 et 13,9 %) sont les plus faibles. Il en est de même à pH égale 5. Ces résultats indiquent que des essais de pH inférieurs à 3 ou supérieurs à 5 ; seraient vraisemblablement défavorables comparés aux essais réalisés à pH 4,5. On peut conclure donc que le pH optimal de *C. curvata* est de l'ordre de 4,5.

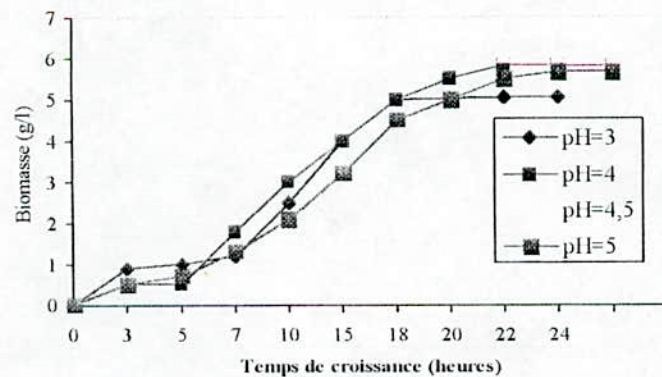


Fig. 12 : Culture de *C. curvata* en minifermenteur sur lactosérum brut. Influence du pH sur la production de la biomasse.

Cependant, King et Zall (1983) et Gianetto *et al.* (1986), trouvent qu'une légère modification de pH ne présente aucun effet significatif sur la cinétique de croissance des levures ; ni sur la capacité de la levure à assimiler le lactose (Ghaly et Eltawell, 1995).

En effet, en absence de régulation de pH, on enregistre au cours de la croissance de *C. curvata* sur les deux milieux de culture (brut et déprotéiné) une baisse de pH (Fig. 13).

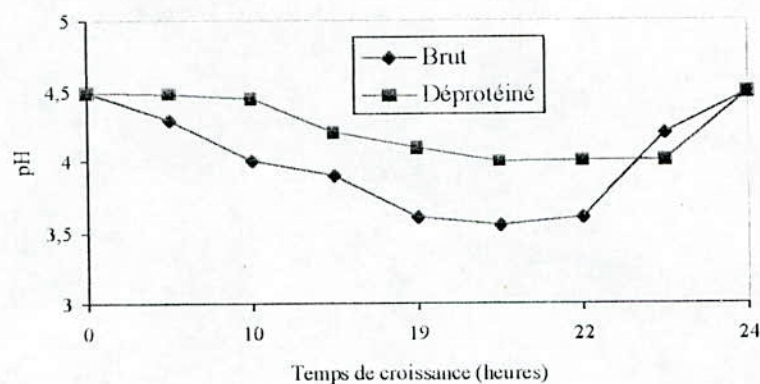


Fig. 13: Variation du pH en fonction du temps de croissance *C. curvata* cultivée sur lactosérums brut et déprotéiné.

La baisse de pH est généralement observée dans la plupart des fermentations et serait due en particulier à la production d'acides organiques par les levures ou par les bactéries présentes dans le milieu de culture à base de lactosérum brut. Le pH tend ensuite vers sa valeur initiale avec l'apparition de l'éthanol dans le milieu (Agnes, 1986).

3.2.2. Influence de la température sur la croissance de *C. curvata*

Des températures de 25, 30 et 35 °C ont été testées lors des cultures en minifermuteur ; afin de déterminer la température optimale permettant d'obtenir le meilleur rendement en biomasse.

L'allure des courbes obtenues (Fig. 14) montre que pour une température de 35 °C le taux de croissance est le plus élevé (0,15 h⁻¹). Cependant, on remarque que le rendement en biomasse (13,6 %) est inférieur à celui obtenu à une température de 30 °C (14,38 %).

Par ailleurs, le taux de croissance (0,12 h⁻¹) et le rendement en biomasse (12,5 %), les plus faibles sont obtenus à 25 °C.

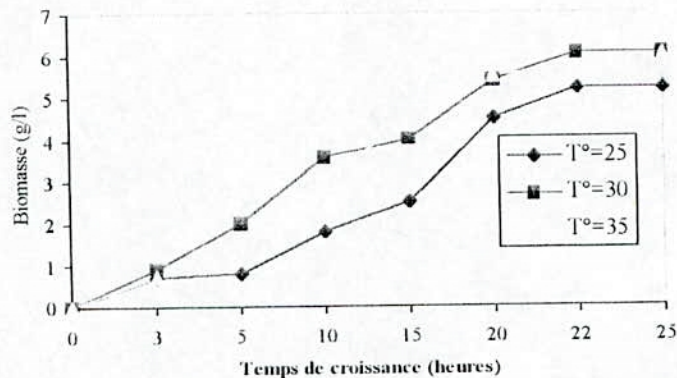


Fig. 14 : Culture de *C. curvata* en minifermuteur sur lactosérum brut. Influence de la température sur la production de la biomasse.

D'après les travaux d'Agnes (1986), le taux de croissance maximale est obtenu pour *Candida pseudotropicalis* à une température de 40 °C. Toutefois, selon Lodder (1971) la température de 37°C est considérée comme optimale pour le développement de la souche *Candida. curvata*.

3.2.3. Influence de la concentration en sucre sur la croissance de *C. curvata*

La cinétique de croissance en fonction de la concentration en lactose de *C. curvata* est étudiée sur du lactosérum brut à différentes concentrations en sucre (20,30 et 40 g/l).

Les courbes et les paramètres de croissance sont indiqués respectivement par la figure 15 et le tableau 11.

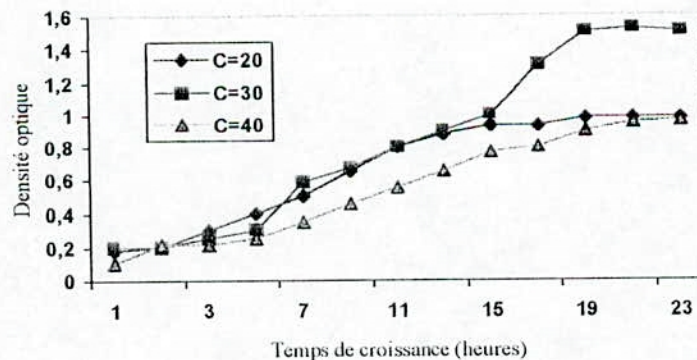


Fig. 15 Cinétique de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut à 20, 30 et 40 g/l de lactose

D'après ces résultats, il apparaît que le temps de latence, le taux de croissance et le rendement en biomasse varient selon la concentration en lactose. On note une augmentation des temps de latence lorsque la concentration en lactose augmente. Rappelons que le temps de latence est le temps qu'il faut à la levure pour synthétiser les enzymes nécessaires au métabolisme glucidique.

Tableau 11: Variation des paramètres de croissance de *C. curvata*, cultivée sur lactosérum brut en fonction de la concentration en lactose

Lactose (g/l)	Temps de latence (h)	Taux de croissance (h ⁻¹)	Matière sèche (g/l)	Quantité de sucre consommée (g/l)	Rendement en biomasse (%)
20	2 h 00	0,17	3,40	17,50	19
30	3 h 15	0,22	6,70	26,25	25
40	3 h 30	0,15	6,00	35,95	16

Le taux maximal de croissance (0,22 h⁻¹) correspondant au rendement en biomasse le plus élevé (25 %) pour *C. curvata* est obtenu pour une concentration de 30 g/l de lactose. Cette concentration semble optimale pour les levures du genre *Candida*.

En effet, Agnes (1986) a obtenu les meilleurs rendements en biomasse pour *C. pseudotropicalis* lorsque celle-ci est cultivée sur lactosérum dilué, avec une concentration finale de 30 g/l.

Toutefois, Miniac (1988) a mentionné qu'à des concentrations élevées en substrat carboné, la pression osmotique du milieu devient considérable et perturbe fortement le métabolisme des levures en provoquant une baisse du taux de croissance, donc de la production de biomasse.

Le plus faible rendement en biomasse est obtenu pour une concentration de 40 g/l de lactose. Hammond *et al.* (1981) attribuent les faibles rendements en biomasse de *C. curvata*, obtenus à des concentrations élevées en sucre, à une perte du substrat carboné transformé en gaz carbonique.

Ces mêmes résultats font apparaître qu'une concentration de 20 g/l de lactose est insuffisante pour assurer une croissance adéquate de la souche. La quantité de biomasse produite est de 3,4 g/l et le rendement est égal à 19 %.

Selon Ykema *et al.* (1988) la consommation des sucres dans le milieu de culture chez les levures est liée à la biologie de la cellule. Elle dépend de l'assimilation et des capacités de stockage du carbone dans les cellules des levures.

D'après Angelis *et al.* (1987), un taux de croissance faible est dû à l'épuisement de l'azote disponible dans le milieu, ce qui ralentit la croissance au profit d'une accumulation de lipides.

3.2.4. Influence de la nature de la source azotée sur la croissance de *C. curvata*.

Afin de comparer l'influence de la nature de la source azotée sur la croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut, nous avons entrepris des essais de supplémentation du lactosérum par une source d'azote minérale et organique. Les travaux de Yoon *et al.* (1982), Glatz *et al.* (1984),

Evans et Ratledge (1984), Jacob (1988), Esther *et al.* (1988) ont signalé l'effet variable de la nature de l'azote dans le milieu de culture sur la croissance des levures oléagineuses.

Delaney et Kennedy (1975), Demeyer *et al.* (1981), Esther *et al.* (1988) ont préconisé des concentrations de 0,1 % pour l'azote organique sous forme d'extrait de levures et de 0,5 % pour l'azote minéral sous forme de sulfate d'ammonium. L'étude de la croissance de *C. curvata* sur lactosérum brut suppléé par l'azote organique ou minéral a permis de tracer les courbes de cinétiques indiquées par la figure 16

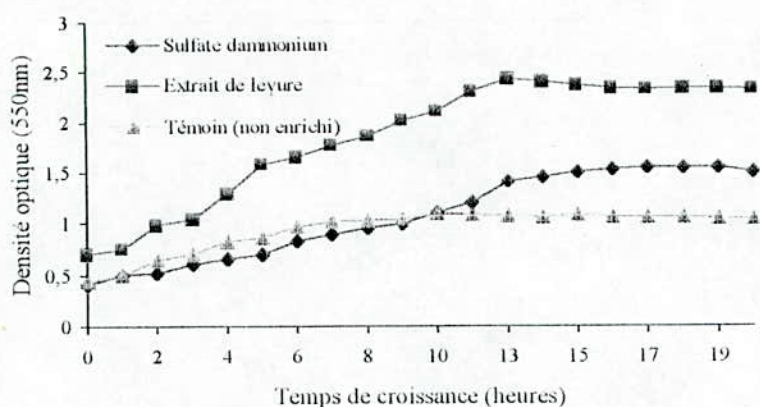


Fig. 16: Cinétique de croissance de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut selon la nature de la source azotée.

Les paramètres de croissances de *C. curvata* déterminés graphiquement à partir des courbes de croissance sont rassemblés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Variation des paramètres de croissance de *C. curvata* en fonction de la nature de la source azotée

Nature de la source azotée	Temps de latence (h)	Taux de croissance (h^{-1})	Matière sèche (g/l)	Quantité de sucre consommée (g/l)	Rendement en biomasse (%)
Sans azote (Témoin)	1 h 50	0,08	2,40	35	5,71
Extrait de levures	1 h 20	0,15	5,02	40	12,50
Sulfate d'ammonium	1 h 00	0,11	4,50	41,8	11,60

D'après les résultats obtenus, nous constatons que la supplémentation du lactosérum par l'azote (minéral ou organique) stimule la croissance de la levure par une diminution des temps de latence,

une augmentation des taux de croissance et une meilleure production de biomasse. Rappelons que l'azote est un élément indispensable à la synthèse protéique et nucléique assurant ainsi la multiplication cellulaire. L'analyse comparée des courbes obtenues (Fig.16) permet de mettre en évidence, également, les variations de la croissance selon la nature de la source azotée. En effet l'allure des courbes montre que l'apport d'azote sous forme d'extrait de levures est plus favorable à la croissance que l'azote sous forme de sulfate d'ammonium. Cet effet, est dû d'une part à l'apport en acides aminés et d'autre part aux facteurs nutritionnels (vitamines et oligo-éléments) et qui sont indispensables à la croissance des levures lactiques (**De La Guérvrière, 1981**).

D'après **Evans et Ratledge (1984)**, cette stimulation de la croissance s'explique par l'utilisation accrue de l'azote par les cellules. Ces auteurs indiquent que *C. curvata* est caractérisée par l'intense activité des enzymes (transaminases, désaminases, perméases...) intervenant dans le métabolisme des acides aminés. Le dosage du lactose résiduel en fin de fermentation indique clairement que l'addition de l'azote dans le lactosérum favorise la consommation de la source de carbone. **Esther et al. (1988)** ont constaté que l'ajout de l'azote notamment l'extrait de levures dans le milieu à base de jus de banane contribue à une meilleure utilisation des sucres par les levures de *C. curvata*. Les rendements en biomasses, font apparaître également, l'effet de la nature de la source azotée sur le taux de conversion en biomasse.

En effet, **Bayer (1981)** a montré que la production de biomasse par *Candida intermedia* sur le lactosérum augmente de 5,4 g/l à 6,4 g/l avec une consommation de lactose de 90 % quand le lactosérum est suppléé par l'azote.

3.2.5. Conclusion

L'étude de la levure *Candida curvata* permet de souligner l'importance de l'influence de la température et du pH sur la croissance de cette levure. Le meilleur rendement en biomasse de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut est obtenu à un pH de 4,5 et à une température de 30 °C. Egalement l'étude de l'influence de la nature et de la concentration des sources azotées et carbonées sur le comportement de cette souche a montré des effets variables sur les paramètres de croissance, la consommation des sucres et sur la production de biomasse.

En effet, les résultats obtenus montrent que la levure ne tolère pas les fortes concentrations en sucres. La croissance de *C. curvata* est optimale à une concentration de 30 g/l en lactose dans le milieu. Les concentrations élevées en sucre inhibent la croissance de la levure et diminuent le taux de consommation du sucre. La production de biomasse est relativement faible. Ces mêmes résultats montrent aussi que la croissance de *C. curvata* est variable selon la nature de la source azotée du milieu. La croissance maximale est obtenue avec l'azote organique particulièrement l'extrait de levures.

Moon *et al.* (1978) ont en effet montré que les ions (NH_4^+) affectent de façon significative la vitesse de multiplication cellulaire alors que l'extrait de levure stimule la croissance et augmente la densité cellulaire finale chez *C. curvata* cultivée sur lactosérum.

4. VALEUR ALIMENTAIRE DES LACTOPROTEINES LEVUREES OBTENUES.

4.1 Qualité microbiologique : Influence de la flore endogène sur la cinétique de *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut.

Etant donné que le milieu de culture à base de lactosérum brut utilisé pour la production de levures n'est pas stérilisé, les germes recherchés en fin de fermentation permettent de contrôler l'évolution de la flore endogène mais surtout de situer sa dominance par rapport à la production de levures en milieu non stérilisé (Tab. 13).

Tableau 13: Résultats de l'analyse microbiologique de la crème de levures récupérée en fin de fermentation

Micro-organismes recherchés	Germes / ml
Flore totale	$12 \cdot 10^4$
Coliformes	300
<i>E. coli</i>	abs
Moisissures	100
Staphylocoques	abs
Streptocoques	abs
Clostridium sulfutoreducteurs	abs

La présence de germes mésophiles et de coliformes dans le moût de fermentation est due d'une part à la multiplication des bactéries initialement présentes dans le lactosérum et d'autre part au développement de bactéries acidophiles et de moisissures (Guiraud et Galzy, 1980).

Rappelons que l'acidification rend les milieux sélectifs vis-à-vis de nombreuses bactéries. Cependant, la présence de cette flore ne semble exercer aucun effet inhibiteur sur la croissance de *C. curvata* puisque le nombre de levures atteint est de $80 \cdot 10^9$ levures/ml en fin de fermentation.

En effet, d'après Bel Industries (1997) le développement d'une flore de 10.000 germes/ml est considéré comme banale devant les milliards de cellules de levures produites.

Le milieu solide de sabouraud a été utilisé pour la numération des levures de *Candida curvata* obtenues après fermentation. La crème de levures obtenue après centrifugation et séchage se présente sous forme de poudre anhydre de couleur beige.

Industriellement une flash stérilisation est réalisée avant le séchage afin de maîtriser la microflore endogène et d'assurer ainsi la qualité bactériologique du produit fini.

D'après **Marshall et al. (1987)**, il en résulte de la croissance bactérienne une diminution du pH suite à la transformation du lactose en acide lactique et à l'apparition d'acides organiques, ce qui explique la baisse du pH (Fig. 13) observée au cours de la cinétique de *C. curvata* sur milieu à base de lactosérum brut.

4.2. Qualité nutritionnelle de la biomasse obtenue

Une comparaison de la composition des lactoprotéines levurées obtenues sur lactosérum brut avec celle des protéines levures de *C. curvata* obtenues sur lactosérum déprotéiné, permettra de définir la qualité du produit final par rapport aux autres levures lactiques.

4.2.1. Teneurs en acides nucléiques

Il est indispensable de démontrer qu'une nouvelle protéine d'origine microbienne soit dépourvue de toxicité avant de l'utiliser pour l'alimentation animale et à plus forte raison humaine.

Les teneurs en acides nucléiques obtenues pour *C. curvata* cultivée respectivement sur lactosérum déprotéiné et brut sont de 5,6 % et 4,09 % de la matière sèche (Tab. 14).

Tableau 14: Comparaison des teneurs en acides nucléiques (%MS) de levures cultivées sur lactosérum avec celle de *C. curvata* cultivée en batch sur lactosérum déprotéiné (1) et brut (2).

Matière sèche (%)	<i>K. fragiles</i> Bassila (1980)	Levure BEL Delaney et Kennedy (1975)	<i>C. curvata</i> (1)	<i>C. curvata</i> (2)
Acides nucléiques totaux	5,7	6,7	5,6	4,09

D'après ces résultats, *C. curvata* ne diffère guère des autres levures habituellement cultivées sur lactosérum.

Les valeurs trouvées sont en deçà de la teneur limite acceptable estimée à 12 % (**Agnes, 1986**).

S'il est bien connu qu'une ration alimentaire trop riche en acides nucléiques peut entraîner à long terme une accumulation toxique d'acide urique, il existe chez les espèces animales une enzyme qui dégrade l'acide urique en allantoin beaucoup plus soluble (**Lehninger, 1985**).

En raison de l'absence de cette enzyme chez l'homme, l'acide urique tend à former des urates insolubles (De La Guerivière, 1981). Toutefois, la consommation de levures par l'homme n'entraîne pas de risque d'accident uricémique à poids égal en protéines ingérées (Kallel, 1993).

Rappelons, qu'actuellement les recherches s'orientent vers l'intégration des cellules de levures vivantes comme probiotiques dans l'alimentation humaine et animale (Rochet, 1999).

4.2.2. Teneurs en lipides et en acides gras totaux

La composition en acides gras des lipides endocellulaires détermine les propriétés nutritionnelles et rhéologiques des levures produites et leur aptitude à la conservation.

L'accumulation des quantités maximales des lipides dans les cellules se produit durant la phase stationnaire. Pour déterminer l'effet de la déprotéinisation sur la qualité de la fraction lipidique de la levure, nous avons étudié la composition des acides gras extraits des lipides de la biomasse de *C. curvata* produite sur les milieux protéiné et brut.

Les teneurs en lipides totaux déterminés par gravimétrie sont respectivement de 39 % pour *C. curvata* cultivée sur milieu déprotéiné et de 43 % pour la même souche cultivée sur milieu brut.

Les teneurs trouvées confirment que la souche *C. curvata* possède des propriétés oléagineuses puisqu'elle a la capacité d'accumuler des taux de lipides supérieurs à 30 % de leur poids cellulaire (Holdsworth *et al.*, 1988). La distribution des principaux acides gras dans les lipides totaux des biomasses de *C. curvata* issues des deux milieux de culture est représentée par les figures 17 et 18.

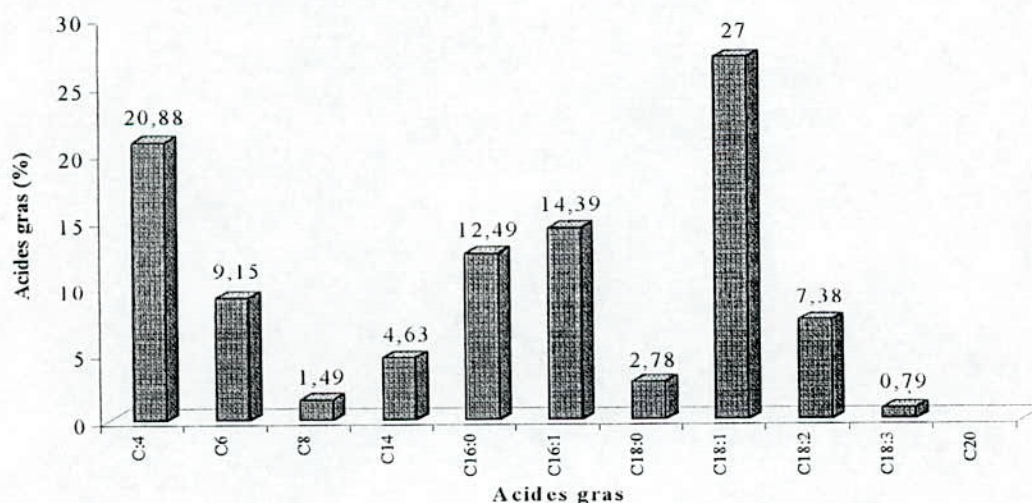


Fig. 17: Répartition des principaux acides gras dans les lipides totaux de *C. curvata* produite sur lactosérum déprotéiné.

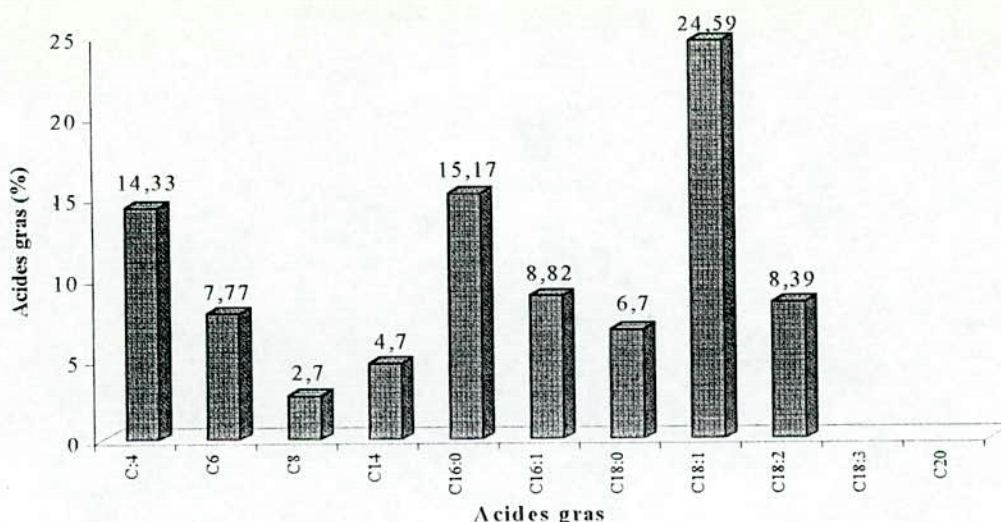


Fig. 18: Répartition des principaux acides gras dans les lipides totaux de *C. curvata* produite sur lactosérum brut.

Une gamme très diversifiée d'acides gras est produite, dont le nombre d'atomes de carbone varie de C4 au C20.

Une étude comparée de la composition en acides gras obtenus révèle une prédominance dans les deux biomasses, des acides palmitique (C16:0), palmitoléique (C16:1) et oléique (C18:1). En l'occurrence, les acides stéarique (C18:0), linoléique (C18:2) et linoléique (C18:3) sont relativement moins abondants. Les acides gras à longue chaîne sont absents (acide arachidonique et cadoléique).

L'acide linoléique est faiblement représenté dans le milieu déprotéiné alors qu'il est totalement absent dans le milieu brut.

L'acide oléique (C18:1) est un acide monoinsaturé majeur dans la plus part des graisses alimentaires. Sa présence est intéressante, selon **Kinsella (1988)** cet acide corrige la déficience en acides polyinsaturés (**Apfelbaum et al., 1982**).

Selon **Metais (1980)**, les acides C18:2 et C18:3 interviennent comme précurseurs de prostaglandines et participent aux structures membranaires de la cellule. Leur carence entraîne des troubles pathologiques au niveau du cerveau .

Il faut préciser que des taux trop élevés en acides gras polyinsaturés ne sont pas recommandés afin d'éviter l'oxydation des levures (**Hammond et al., 1981**).

La présence d'acides gras à courtes et moyennes chaînes est notée (C4-C8), l'acide butyrique (C4) est prédominant. Cette observation est intéressante puisque ces acides sont absents dans les huiles végétales (**Angellis et al., 1987**).

Rappelons que ces acides gras présentent un comportement métabolique particulier caractérisé par une digestion, une absorption et un transport plus rapide. Ces acides gras sont utilisés pour certains cas pathologiques (déficit en carnitine, hyperlipidémie...) (**Douste et Mendy, 1988**).

Toutefois, le milieu à base de lactosérum brut est plus favorable à l'accumulation des lipides.

Une étude d'**Evans et Ratledge (1983)** sur le métabolisme de *C. curvata* a démontré que lorsque la croissance de la levure diminue, la synthèse des constituants cellulaires non lipidiques est fortement réduite alors que la biosynthèse des lipides prédomine.

En outre, **Brown et al. (1989)** ont montré que le taux de lipides augmente lorsque le taux de croissance de la levure diminue.

Selon **Ratledge (1987)**, la vitesse de croissance a un effet déterminant sur le taux de lipides produits par les levures. Une faible vitesse de croissance favorise une consommation plus importante du substrat carboné au profit d'une accumulation de lipides.

A partir de nos résultats nous constatons clairement l'effet du taux de croissance de *C. curvata* sur la production de lipides.

En effet, pour un taux de croissance de $0,23 \text{ h}^{-1}$ obtenu sur milieu déprotéiné la teneur en lipides est de 39 % alors que pour un taux de croissance de $0,13 \text{ h}^{-1}$ obtenu sur milieu brut, la teneur en lipides est de 43 %.

Une étude menée par **Choi et al. (1982)** sur *Rhodotorula gracilis* a montré qu'une augmentation du taux de croissance de $0,02$ à $0,09 \text{ h}^{-1}$ conduit à une diminution de la teneur en lipides totaux de 50 à 14 % et à une augmentation de la teneur en protéines de 8 à 37 % du poids cellulaire.

Nos résultats concordent avec ceux de nombreux auteurs qui ont étudié la souche *C. curvata* cultivée sur différents milieux (**Hammond et al., 1981 ; Yoon et al., 1982 ; Evanes et Ratledge, 1983 ; Rolph et al., 1990 ; Amrouche, 1996**).

4.2.3. Teneurs en acides aminés

L'efficacité protéique des aliments dépend non seulement de leur teneur totale en protéines mais également de la composition en acides aminés. Par rapport à la matière sèche, la teneur en protéines des levures de *C. curvata* cultivée sur lactosérum déprotéiné est estimée à 38,2 % et celle des lactoprotéines levurées obtenue sur milieu brut est de 43,5 %.

Les pourcentages en acides aminés déterminées par chromatographie liquide de *C. curvata* cultivée sur les deux milieux de fermentation sont regroupés dans le tableau 15.

L'analyse des acides aminés de cette souche cultivée sur lactosérum déprotéiné présente un profil en acides aminés comparable à ceux déterminés par **Barraquio (1981)** et par **El-Samragy et al. (1988)** pour une souche de la même espèce.

Tableau 15 : Composition en acides aminés des protéines levures et des lactoprotéines levurées de *C. curvata*

Acides aminés pour 100 g de protéines	Protéines levures de <i>C. curvata</i>	Lactoprotéines levurées de <i>C. curvata</i>
Aspartate	2,70	4,05
Sérine	5,04	6,11
Glutamate	4,38	6,13
Glycine	2,97	2,25
Histidine	3,72	3,72
Arginine	3,13	4,49
Thréonine	9,72	9,29
Alanine	2,67	2,99
Proline	4,14	4,21
Cystéine	-	-
Tyrosine	1,80	6,74
Valine	3,51	3,72
Méthionine	1,79	2,68
Lysine	2,84	4,38
Isoleucine	4,72	4,32
Leucine	6,29	7,24
Phénylalanine	7,43	8,92

Parmi les huit acides aminés reconnus indispensables (lysine, leucine, thréonine, valine, isoleucine, phénylalanine, méthionine, tryptophane) sept se retrouvent dans les deux aminogrammes de *C. curvata*.

Ces derniers font apparaître une prédominance en phénylalanine, leucine, thréonine, sérine et en glutamate.

Les levures obtenues présentent une déficience en cystéine et en tryptophane. Il est probable que lors de l'hydrolyse acide, ces deux acides aminés sont détruits (**Hederson, 1977**). Les lactoprotéines levurées obtenues sur lactosérum brut présentent des taux élevés en acides aminés par rapport à ceux des protéines levures obtenues sur milieu déprotéiné (Fig. 19). Les protéines du lactosérum ne sont pas dégradées au cours de la fermentation, ce qui contribue d'après **Meyrath et al. (1979)** à augmenter le taux en acides aminés du produit final. Rappelons que le lactosérum contient les huit acides aminés essentiels.

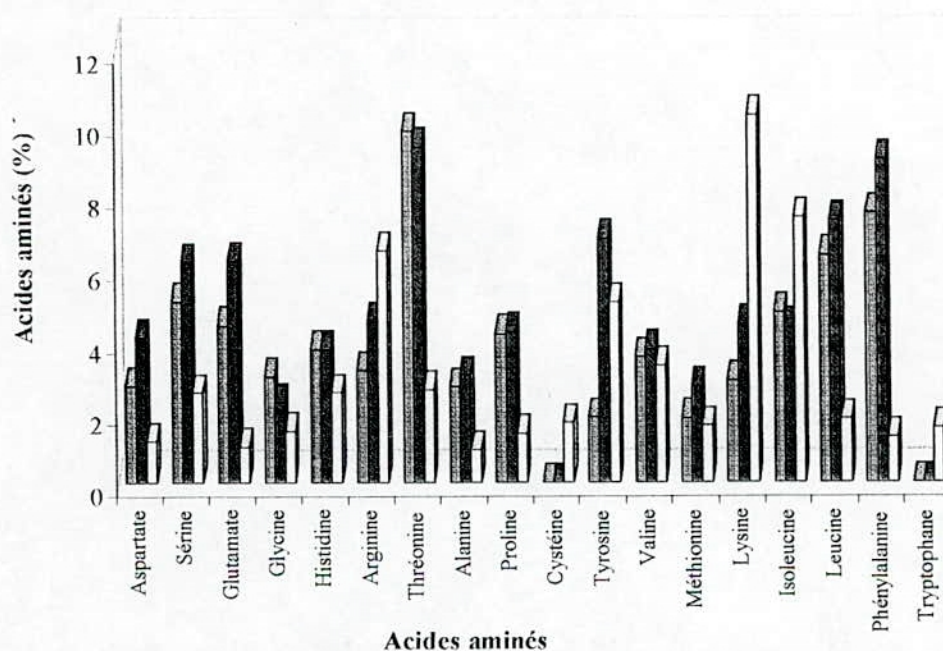


Fig. 19: Composition comparée des acides aminés des protéines de :

- Levures de *C. curvata*,
- Lactoprotéines levurées de *C. curvata*
- Lactosérum brut

Par rapport aux céréales usuelles (blé, maïs) utilisées en alimentation animale, les lactoprotéines levurées obtenues contiennent plus de méthionine et de lysine, ce qui leur confère une aptitude à compléter et à équilibrer les régimes à base de céréales sachant que la méthionine et la lysine sont les principaux facteurs limitants de beaucoup d'aliments. Actuellement, l'apport de ces deux acides aminés sous forme d'acide de synthèse (L. lysine et DL. Méthionine).

Rappelons que la méthionine est indispensable pour la production de kératine chez le mouton, et que la lysine favorise la croissance osseuse, stimule la division cellulaire ainsi que la synthèse des nucléotides.

4.2.4. Teneur en vitamine E

La vitamine E connue depuis des décennies comme vitamine de fécondité est utilisée en alimentation animale pour renforcer l'immunité de l'animal, diminuer la tendance au stress et pour ralentir l'altération de la viande après l'abattage (Noberts, 1997).

La quantité de tocophérols présente dans le lactosérum de Boudouaou est de 0,36 mg/l de lactosérum.

Les teneurs en vitamine E obtenue pour *C. curvata* cultivée sur milieu déprotéiné et brut sont respectivement de 36,6 mg et de 32 mg de vitamine E pour 100 g de levures. Ces valeurs sont en accord avec les teneurs proposées par les Industries Bel pour une levure aliment.

La teneur en vitamine E de la crème de levure obtenue sur milieu déprotéiné est plus importante.

4.2.5. Conclusion

L'ensemble des résultats de l'analyse des différents constituants de la biomasse de *C. curvata* cultivée sur lactosérum déprotéiné nous permet d'établir une estimation de la composition de cette levure.

La principale originalité comparée aux autres levures lactiques consiste en la richesse en acides aminés essentiels des lactoprotéines levurées, et leur faible teneur en acide linoléique, ce qui représente un atout pour la conservation.

Par ailleurs, il est important de noter que la composition de la biomasse ne semble guère affectée par les conditions de cultures (milieu brut). Les lactoprotéines levurées obtenues présentent les caractéristiques essentielles analogues à celles d'une levure aliment.

Du point de vue hygiénique, la levure *C. curvata* cultivée sur lactosérum brut reste non seulement présente dans le milieu de culture, mais est aussi dominante au sein de la microflore endogène.

**CONCLUSION
GENERALE**

Conclusion générale

L'analyse biochimique du lactosérum a permis de mettre en évidence des aptitudes nutritionnelles, très intéressantes pour l'alimentation humaine et animale.

En effet, le profil chromatographique des protéines sériques indique la présence de tous les acides aminés essentiels.

En Algérie, l'industrie laitière a pris un large essor et la production de lactosérum augmente chaque année. La laiterie ORLAC de Boudouaou, rejète pour la fabrication fromagère quotidiennement plus de 6 000 litre/jour de lactosérum, ce qui représente autant de matière polluante que de ressources alimentaires. Malheureusement, le secteur concerné réagit très lentement face à ce problème.

L'objectif de notre étude est de mettre au point un procédé d'utilisation du lactosérum à l'état brut permettant :

- Une valorisation, par la fabrication d'un produit destiné à l'alimentation animale et caractérisé par un apport de protéines de qualité.
- Une dépollution par la transformation et l'élimination de la quasitotalité de la charge organique soluble.

Le procédé proposé est simple puisqu'il consiste à enrichir le lactosérum brut par la croissance en culture discontinue non stérile d'une souche de levures qui métabolise le lactose.

La réfrigération à une température inférieure à 10° C permet le stockage du lactosérum au delà de 24 heures en attendant son utilisation.

Le lactosérum utilisé comme matière première non pasteurisée, contient une flore endogène composée essentiellement de ferments lactiques, de levures et de moisissures. La culture de la levure *Candida Curvata*, sur le lactosérum non pasteurisé est en fait une culture mixte de cette souche avec ces micro-organismes.

L'étude microbiologique du mout de fermentation en fin de culture a cependant montré que pour une culture discontinue la levure utilisée reste dominante au sein de toute la population microbienne. En effet, le taux de levures obtenu en fin de fermentation est égal à 80.10^9 levures/ml.

Néanmoins, la culture continue demeure naturellement la meilleure solution pour une production de protéines, cependant les risques de contaminations par les coliformes et les contraintes techniques de stérilité font que son utilisation soit difficile dans le cas d'un lactosérum non stérilisé.

L'étude de la cinétique de croissance de la levure *Candida curvata* cultivée sur lactosérum brut a permis de mettre en évidence les performances de cette souche de levures à métaboliser le lactose en présence des protéines sériques. En effet, la quantité de matière sèche produite est de 6,04 g/l avec un rendement en biomasse de 14,38 %. Toutefois, ce rendement reste inférieur à celui obtenu sur milieu déproteiné (18,7%).

L'apparition d'éthanol en fin de culture reste cependant inévitable, il semble que la souche utilisée soit sensible à l'effet pasteur.

Les études de l'influence de la température et du pH nous permettent de conclure qu'une température de 30° C et un pH de 4,5 constituent les conditions appropriées pour un meilleur rendement.

La souche *Candida curvata* est mésophile et légèrement acidophile. Ces deux critères sont importants dans la mesure où l'on souhaite produire des lactoprotéines levurées en utilisant un lactosérum non stérilisé en milieu acide. La croissance de la microflore endogène du lactosérum est alors inhibée.

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent également qu'une concentration en lactose de 30 g/l est considérée comme optimale. Ces mêmes résultats montrent que l'addition d'une source d'azote influe sur la croissance. Le taux de croissance ($0,13 \text{ h}^{-1}$) obtenu sur lactosérum suppléé simultanément par de l'extrait de levures et du sulfate d'ammonium est nettement plus élevé que celui obtenu sur lactosérum brut ($0,085 \text{ h}^{-1}$).

Cependant, en vue de limiter une complémentation onéreuse du milieu, les essais entrepris ont montré que la quantité de biomasse obtenue avec de l'extrait de levures est supérieure à celle obtenue sur lactosérum avec du sulfate d'ammonium. Cet effet est dû à l'apport en acides aminés, en vitamines et en oligo-éléments par l'extrait de levures. Les rendements respectifs sont de 12,5 % et 11,6 %.

L'enrichissement du lactosérum par *Candida curvata* a permis donc d'obtenir un produit composé de protéines sériques et de protéines levures présentant un grand intérêt nutritionnel par sa composition en acides aminés, en tocophérols, en lipides et par sa faible teneur en acides nucléiques. La pauvreté en acide linoléique de la levure confère à la biomasse une bonne aptitude à la conservation.

Des travaux réalisés au centre de recherche des fromageries BEL ont permis de stabiliser le taux de lipides et de maîtriser l'action des métaux sur le rancissement oxydatif des lipides.

Il semble d'après les résultats obtenus au cours de notre étude que l'épuration totale du lactosérum brut et la production de protéines sur lactosérum non pasteurisé soit possible.

Néanmoins, un tel procédé de valorisation conviendrait particulièrement aux fromageries de faibles capacités.

La mise en route d'un fermenteur pilote, l'examen de l'innocuité des lactoprotéines levurées constitueront l'étape ultérieure de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. **Adrian J., 1981** - A propos de poudre de lait et des lactoprotéines levurées. Ind. agro. alim., 88, pp. 1607-1609.
2. **A.F.N.O.R., 1986** - Méthodes d'analyses du lait et ses produits laitiers. Recueil de Normalisation Française, 2^{ème} édition 580p.
3. **Agnes M., 1986** - Production de protéines levurées à partir de lactosérum brut. Thèse 3^{ème} cycle, Univ. Lyon I, 133p.
4. **Alais C., 1981** - La valorisation du lactosérum. Les bases et les problèmes. Technique laitière, 592, pp. 7-10.
5. **Amrouche T., 1996** - Influence de la source carbonée et azotée sur la composition en acides gras des lipides de *C. Curvata*. Thèse Magister, Inst. Nat. Agro., El-Harrach, 144p.
6. **Angelis G., Pina M., Ratomahenia R., Arnaud A., Graille J., Galzy P., Martin P. & Perraud J P., 1987**- Production des huiles riches en acides gamma linoléiques par diverses souches de phycomycètes . Oleagineux. vol. 42 (10), p. 39.
7. **Apfelbaum M., Forrat C., & Nillus P., 1982** - Abrégé de diététique et de nutrition. Ed. Masson, Paris, pp. 48-55.
8. **Barraquio N L., 1981** - Cheese whey for protein rich animal supplement. Technol. J., 6, pp. 14-21
9. **Bassila I., 1980** - Etude comparée de quelques souches de levures en vue de leur culture sur du lactosérum. Thèse 3^{ème} cycle, Biologie végétale option Mycologie, Univ. Lyon I.
10. **Bayer K., & Meyrath J., 1979** - Feed yeast production from whey. Cong. inter. microb. ind.. alim., Paris, pp. 91-101.
11. **Bayer K., 1981** - Trace element supplementaion of cheese whey for the production of feed yeast. J. Dairy Scient., 66, pp. 214-220.
12. **Bel Industries, 1997** - Protibel : Protéines unicellulaires. Bul. comm., 8 p.

13. **Blum J. C., 1989** Matière première et activateur de croissance pour la fermentation. - Recommandations alimentaires: L'alimentation des animaux monogastriques. Porc, lapin, volaille. 2^{ème} Ed. I.N.R.A., Paris, pp 49-66.
14. **Boudier J.F., & Luquet F.M., 1980** - Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. APRIA, 21, 136 p.
15. **Bouix M. & Leveau J. Y., 1980** - Les levures: Le contrôle Microbiologique Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires., Tome 3, éd Bourgois et Leveau, Lavoisier Paris pp. 130-145.
16. **Broom M. C. & Willman N., 1982** - The use of cheese whey protein concentrate in the of skin milk yoghurt. Aush. J. Dairy. Tech., 37, pp. 139-142.
17. **Brown B. D., Hush K. H., Hammond E. G. & Glatzy B. A., 1989** - A relation ship manufacture between growth and lipid accumulation in *Candida curvata* D. Journal of fermentation and bio engineering, vol. 68, 5, pp. 344-352.
18. **Brunschwing P., 1999** - Les levures : Performances à confirmer. Rev. de l'alimentation animale, 524, p. 51.
19. **Castillo F. J. & Sanchez S. B. 1978** - Studies on the growth of *K. fragilis* in whey for the production of yeast protein. ACTA. scient. venezolano, 29, pp. 113-118.
20. **Chambre M., 1984** - Concentrés protéiques laitiers obtention, utilisation et valeur nutritionnelle. Cah. nutr. diet., 29, pp. 166-170.
21. **Champagnat A. & Adrian J., 1974** - Pétrole et proteines, Ed. Doin, pp. 178 - 195
22. **Choi S.Y., Ryn. D. Y. & Rhee J. S., 1982** - Production of microbiol lipid effects of growth rate and oxygene in lipid synthesis and fatty acid. Composition of *R. gracilis*. Biotech. Bioeng., 24, pp. 1165-1172.
23. **Cohen S.A., Antonis k. & Michaland D.P., 1993-** Compositional protein analysis using 6,aminoquinolyl-N hydroxysuccinimidyl carbamate. Techniques in protein chemistry IV , R.H.Angelitti, Ed.,Academic Press , San Diego.pp.289-298.
24. **Crippen K. L. & Jeon J. J., 1983** - Direct acid set cottage cheese whey as a base for a shelf stable athletic :type drink. Journal food protection, 47, pp. 53-57.
25. **Damiano D., Shin C. S., Ju N. H. & Wang S. S., 1985** - Performance, kinetics and substrate utilization in a continous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membrane. Applied Microbiology Biotechnology (21) pp. 69-77.

26. **Davenport R. R., 1980** - An introduction to yeasts and yeast like organisms. In Skinner F.A., Passmore S. M and Davenport R. R., *Biology and activities of yeasts*. Academic press, pp. 1-23.
27. **Décleire M., Vanhuyun A, & Callbaut A., 1991** - La valorisation du lactosérum comme une solution alternative à la lutte contre la pollution des eaux. *Agrocontact*, 234, pp. 1-6.
28. **De la bourdenaye A., 1974** - Le lactosérum aliment pourquoi ? *Rev. Lait.*, 323, pp. 541-557.
29. **De la guerviere J. F., 1981** - La production et la valorisation des levures lactiques. *Ind. agro. alim.*, 5, pp. 395-400.
30. **Delaney A. N. & Kennedy R., 1975** - Composition of *S. fragilis* biomass grown on lactose permeat. *J. sci. food. agric.*, 26, pp. 1177-1186.
31. **Demeyer A., Jacob F, Jay M. & Perrier S., 1981** - La conversion bio-énergétique et les biotechnologies. *Tech. doc.*, Paris, 352 p.
32. **Dewit J. N. & Hontelez E., 1981** - Les propriétés fonctionnelles des protéines du lactosérum. *Techn. Lait*, 952, pp. 19-22.
33. **Dousset X. & Levesque A., 1986** - Action des protéases des bactéries du lait sur la qualité des produits laitiers. *Ind. agro. alim.*, pp5-9.
34. **Douste Blazy L. & Mendy F. 1988** - Biologie des lipides chez l'homme de la physiologie à la pathologie. *Ed. Medic. journ. Intern.*, Paris, pp. 3-69.
35. **Douzou P., Duran G., Kourilsky Y. P., & Siclet G. 1993** - Les biotechnologies. *Que sais je*, Ed. Bouchene, Alger, 127 p.
36. **Dubois M., Giles K. A., Hamilton K. J., Rebers P. H. & Smith F., 1956** - Colometric method for determination of sugars and related substances. *Ana. Chem.*, 28, pp. 350-356.
37. **Duche A., Lefevre P., Bernard G. & Berdon D., 1992-** les techniques d'analyses d'aliments du betail appliquées au C.I.R.A.D., *Ed. I.E.M.V.T.* , 79p.
38. **EL Samragy. A., Chen J. H. & Zall R. R., 1988** - Aminoacids and mineral profile of yeasts biomass produced from fermentation of cheddar whey permeate. *Process biochemistry*, 23, pp. 28-30.
39. **Esther Z. V., Glatz B. A. & Hammond E. G., 1988** - Optimization of banana juice fermentation for the production of oil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, 3, pp. 748-752.

40. Evans C. T. & Ratledge C., 1983 - A comparison of the oleaginous yeast *Candida curvata* grown different carbon source in continuous and batch culture. *Lipids*, vol. 18, (9), pp 623-629.
41. Evans C. T. & Ratledge C., 1984 - Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *J. gene. microbiol.*, 130, pp.1705-1710.
42. Evette J. L., 1975 - La fromagerie. Techniques vivantes, Pres. univ., Fran. Paris, 141p.
43. Ferraudo R. & Truhaut R., 1976 - Considérations générales sur les aspects toxicologiques des protéines d'organismes unicellulaires en alimentation animale. Col. D. G. R. S. T. sur les P. O. U., Paris, pp. 10-11.
44. Fevrier C. & Toullec R., 1981 Utilisation du lactosérum en alimentation animale. *Tech. Lait*, 952, pp. 47-49.
45. Forsum E., 1977 - Use of whey protein concentrate as a supplement to maize, rice and potatoes. A chemical and biological Evaluation using growing wats. *Journ. nutri.*, 105, pp. 147-153.
46. Fox P. F., & O'connor F., 1969 - Caractéristiques de conservation du lactosérum brut et concentré. *Ind. agric.*, 8, pp. 183-190.
47. Gerard B., 1978 - Les sources de protéines dans les aliments volailles. *Cahier tech. l'ITAWI*, pp. 124-131.
48. Ghaly A. E. & Singh K. R., 1989 - Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Bioch. Biotech.*, vol. 22, pp. 220-228.
49. Ghaly A. E. & Benhassen R. M., 1995 - Kinetics of batch production of single cell protein from cheese whey. *Applied biochemistry and biotechnology*, vol. 50, pp. 79-91.
50. Ghaly A. E. & El taweel A. A., 1995 - Effect of lactose concentration on batch production of ethanol from cheese whey using *C. tropicalis*. *A. D. A. E.*, paper, vol. 38, 4, pp. 1113-1120.
51. Ggianetto A., Berrut F., Glick B.R. & Kemphon A. G., 1986 - The production of ethanol from lactose in a tubular reactor by immobilized cells of *K. fragilis*. *Applied microbiol. biotechnol.*, 24 (2), pp. 277-281.

52. Glatz B. A., Hammond E. G., Hsu K. H., Bachman L., Bati N., Brown D. & Floetznmeyer M. D., 1984 - Production and modification of fats and oils by yeasts fermentation, In biotechnology of the oils and fats industry. Ratledge C., Dawsson P., editors. A.O.C.S. Champaign I.L., pp 162-176.
53. Guillot J. F., 1999 - Les probiotiques : Une procédure d'homologation stricte gage de crédibilité. Rev. alim. anim., hors série, Mai 1999, pp. 6-7.
54. Guillou H., Pellissier J. P. & Grappin R., 1976 - Méthodes de dosage des protéines du lait de vaches. Le lait, 66, pp. 143-175.
55. Guiraud J. & Galzy P., 1980 - L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. Usine Nouvelle, Paris, pp. 139-141.
56. Hammond E. G., Glatz B. A., Choi Y. & Teasdale M. T., 1981 - Oil production by *Candida* and extraction composition of the oil. J. A. O. C. S., 9, pp. 171-187.
57. Hammond E. G. & Glatz B. A., 1988 - Biotechnology applied to fats and oil. Food *curvata* biotechnol., vol. 2, 6, pp. 173-217.
58. Herderson C., 1977 - Contribution à l'étude des productions de protéines d'organismes unicellulaires continue : influence des conditions de croissance. Thèse Docteur Ingénieur, Univ. Toulouse.
59. Holdsworth J. E., Venhuis M. & Ratledge C., 1988 - Enzymes activities in oleaginous yeasts accumulating and utilizing exogenous or endogenous lipids. J. gene. microbiol., 134, pp. 2904-2915.
60. Humbert G., 1981 - Nouvelles voies de valorisation des protéines lactosériques. Techn. Lait, 952, pp. 73-74.
61. Jacob Z., 1988 - Selective medium for the production of lipids by *Rhodotorula gracilis* CFR1., Journ. Food Techn., vol. 25 (6), pp. 373-374.
62. J. O. R. A., 1998 - Normes microbiologiques. Journ. répub. alg., 27 mai 98 (35), 26 p.
63. Kallel H., Garrido ., Sanchz L., Engasser J. M. & Miclo A., 1991 - Optimisation d'une culture continue de *K. fragilis*. Microbiol. alim. nutr., vol. 9, pp. 309-317.
64. Kallel H., 1993 - Production de levures à partir de lactosérum. Thèse 3^{ème} Cycle, Univ. Lyon, pp. 32-51.
65. King V. A. E. & Zall R. R., 1983 - Ethanol fermentation of whey using calcium alginate entrapped yeast. Process biochem., pp. 18.

66. Kinsella E. J., 1988 - Food lipids and fatty acids : importance in food quality. Nutrition and health., Food tech., 11, pp. 124-142.
67. Knopfel H., 1974 - Zuratmung und goirung Bei Hefen, *Schweizer Brauerl.* Run Deschrau, 85, pp. 1-14.
68. Kosikowski E. V., 1979 - Utilisation du lactosérum et de produits à base de lactosérum. Rev. Laitière, 952, pp. 93-97.
69. Kosikowski E. V., 1981 - Boissons de lactosérum ayant une valeur potentielle. Tech. Lait., 952, pp. 93-96.
70. Kurtzman C. P., 1990 - Classification and general proprieties of yeasts, In yeast. Biotechnology and Biocatalysis. Dekker, Ed. N. Y., pp. 1-34.
71. Larpent J. P. & Larpent-Gourgand M., 1985 - Eléments de microbiologie, Ed. Herman , Paris., p 464.
72. Lehniger A., 1985 - Principe de Biochimie :Biosynthèse des acides nucléiques . Ed. Flammarion Médecine Sciences, pp. 630-640.
73. Lecoq R., 1965 - Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Ed. Doin , T. II, Paris, pp. 1224-1227.
74. Lessafre Industries, 1999 - Une gamme d'additifs pour l'alimentation animale .bpoitreau @ Lessafre.com.
75. Levine D. & Conney C., 1975-Production of S.C.P. from methanol, Food.Tech. 129,(2) pp.33-42.
76. Lin C. C. S. & Feng Y. C., 1987 - Conventional and rapid methods of yeast identification. C.R.S. critical review in microbiology, vol. 14.
77. Lodder J., 1971 - The yeasts, a taxonomic study, Ed. North Holland publishing compagny, amsterdam, London. 1385p.
78. Macoun R. G., Shen Y. R., Fane A. G., & Fell J. D., 1991 - Nanofiltration : Theory and application to ionic separation. 19th Australian chemical engineering conference, pp.398-405.
79. Mann E., 1984 - L'utilisation des produits laitiers en boulangerie et en pâtisserie. Rev. Lait, France, 432, pp. 31-34.
80. Marshal N., Bourdon J. L. & Michard C. L., 1987 - Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification des bactéries, Ed. Don, Paris, pp. 180-369.

81. Mereo M., 1971 - Les utilisations industrielles du sérum de fromagerie. Ind. agro. alim., 88, pp. 817-823.
82. Metais P., 1980 - Les acides gras essentielles. Cah. Nutr. Diet., vol. 15, 3, pp. 227-234.
83. Meyrath J., & Bayer K., 1979 Biomass from whey, In Economic Microbiology ed. Rose A.H. Academic press, New York.
84. Miniac M. D., 1988 - Conduite des ateliers de fermentation alcoolique de produits sucriers. Ind. agro. alim. 718, pp. 675-688.
85. Molinero R., 1977 - Production de lacto-proteines levurées. Col. lactosérums, Paris 17-18 Déc. 1977. pp.83-95.
86. Montreuil L., 1971 - Les lactosérums, une richesse alimentaire. Col. D. G. R. S. T., Apria, Paris, pp.7-11.
87. Monus M. & Miniac M., 1985-Gain de productivité d'éthanol en fermentation alcoolique des produits de sucreries. Ind. agro. alim., 10 (102), pp. 971-985.
88. Moon N. J., Glatz B.A. & Hammond E. G., 1978 - Conversion of cheese whey and whey permeate to oil and single cell protein. Journ. Dairy. sci., 61, pp. 1537-1547.
89. Moore S. & Stein W. H., 1963 - Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment. Methods in Enzymology, Acad. press, New-York, 6, pp. 875-886.
90. Morel d'arleux F. & Girard P., 1984 - Le point sur le lactosérum - Aliment des bovins. Ed. Ins. tech. élev. bov., Paris, pp.6-15.
91. Moreton R.S., 1985-Modification of fatty acids composition of lipids accumulating yeast with cyclopropane fatty acid desaturase inhibition. App.Microbiol Biotechnol. 33, pp.41-45.
92. Moreton R. S., 1988 - Physiology of lipid accumulating yeasts. In « Single Cell Oil » Moreton R.S. Ed. Logman Scientific and technical, Harlow, U.K., pp. 1-32.
93. Moulin G., Malige B. & Galzy P., 1981 - Etude physiologique de *K. Fragilis* : conséquence pour la production de levures sur lactosérum. Le lait, pp. 323-332.
94. Noberts A., 1997 - Influence de la vitamine E sur la qualité de la viande. Info serv. alim. ani., BASF, chimie Fine, 52/97, 6p.

95. **Nour El Dien H., 1982** - Attempts to utilize whey for the production of yeast protein, Part III : Effect of some vital growth factors. *ACTA-alimentaria*, 11, pp. 125-134.
96. **O. N. L., 1984** - Analyses physico-chimiques des produits laitiers, *Rev. Méth. lab. nat. lait belge*, 1/84, pp. 6-11.
97. **Pepper D., 1987** - Concentration of whey by reverse osmosis. *Bul. intern. Dairy Federation*, 212, pp. 25-26.
98. **Perry M. & Linder C., 1989** - Intermediate reverse osmosis ultrafiltration. *Rev. Ind. agro. alim.*, vol.71, pp.233-245.
99. **Petrauxiene D. & Lapied L., 1981** - La qualité bactériologique du lait et des produits laitiers. *Analyses et tests*, tech. doc., Paris, 228 p.
100. **Physan Industries, 1999** - Thermolyse des levures. *Rev. alim. anim.*, 532, jan.-fév., p. 27.
101. **Ratledge C., 1987** - Lipids and their metabolism. In *Metabolism and Physiology of yeasts*, Rose A.H. Ed. London Academic press, pp. 368-446.
102. **Ratledge C., 1988** - Biochemistry, Stoichiometry, substrats and economics. In *Single cell oil* R.S. Moreton. Ed. Longman Harlow, UK., pp. 33-70.
103. **Ratledge C., 1989** - Biotechnology of oil and fats. In *Microbiol lipids*. Vol. 2, Ratledge C. and Wilkinson S.G. Ed., pp. 438-567.
104. **Robin O., Kalab M., Britten M. & Paquin P., 1996** - Microfluidization of model dairy emulsions : Influence of composition and process factors on the protein surface concentration. *Le lait*, 76, pp. 551-570.
105. **Rochet B., 1999** - La nutrition animale : un axe stratégique majeur. *Rev. alim. anim.*, p.14.
106. **Roger L., Brule G. & Maubois J. L., 1981** - Nouvelles voies de valorisation des protéines lactosériques, Hydrolyse des protéines lactosériques : intérêt thérapeutique. *Tech. lait.*, 952, pp. 65-67.
107. **Rolph C. E , Moreton R. S & HarWOOD J. C., 1989** - Acyl liquid metabolism in the oleaginous yeast *Rhodotomla gracilis* CBS3043. *Lipids*, vol. 24 (8), pp. 715-720.
108. **Rolph C. E., Moreton R. S. & Harwood J. C., 1990** - Control of acyl lipids desaturation in the yeast *R. Gracilis* Via the use of the cyclo propenoide fatty acid sterculate. *Appl. microbiol. biotechnol.*, 34, pp. 91-93.
109. **Rose A. H. & Harrison J. S., 1971** - Physiology and biochemistry of yeasts. Academic press, vol.2, London and New-York, 571 p.

110. Sanchez C., Pouliot M., Gauthier S. F. & Paquin P., 1997 - Thermal aggregation of whey protein isolate containing microparticulated of hydrolyzed whey proteins. *J. agri. food. chem.*, 45 (7) pp. 2384-2392.
111. Scriban R., 1993 – Biotechnologie. Tech. doc., Lavoisier, Paris, 591 p.
112. Sobus M. T. & Holmlund C.E., 1976 - Lipids analysis., *Lipids*, 11, 341 p.
113. Sottiez P., 1985 – Produits dérivés des fabrications fromagères. Ed. Lavoisier, Lait et produits laitiers, T. II, Paris, pp. 357-392.
114. Towler C., 1982 – Utilization of whey protein products in pasta. *N. Z. J. dairy scien. tech.*, 17, pp. 229-236.
115. Wolff J. P., 1968 – Manuel d'analyses des corps gras. Ed. Azoulay, Paris.
116. Yoon S. H., Rhim J. W., Choi S. Y. & Rhee J. S., 1982 – Effect of carbon and nitrogen sources on lipid production of *R. Gracilis*. *J. ferment. tech.*, 60, pp. 243-246.
117. Youyou A., 1986 - Effet des carences sélectives en acide linolenique au niveau des fractions subcellulaires et cellulaires du cerveau de rat en développement. Thèse Doctorat Sciences (Nutrition), Univ. Paris, pp. 45-60.
118. Ykema A., Verbere E. C., Kater M. M. & Smith H., 1988 – Optimization of lipid production in the oleaginons yeasts: *Apiotrichum curvatum* in whey permeate. *Appl. microbiol. tech.*, 29, pp. 211-218.
119. Zadow J. C., 1984 – Utilization of milk components ; whey new Zeland. *J. dairy scien. tech.*, 11, pp. 273-316.

ANNEXE

1. Composition des milieux utilisés pour l'étude physiologique de la levure *C. curvata*

1. Milieu Sabouraud

Extrait de levures	3 g
Glucose	20 g
Peptone	10 g
Agar	20 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml
pH	4,5

2. Milieu Wickerham

Extrait de levures	10 g
Peptone	5 g
Bleu de Bromothymol	0,005 g
Eau distillée	1000 ml
pH	4,5

3. Milieu auxanogramme utilisé pour l'assimilation des sucres

Sulfate d'ammonium	5 g
Deshydrogénophosphate de potassium	1 g
Sulfate de magnésium	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée (qsp)	1000 ml

4. Milieu utilisé pour l'assimilation des nitrates

Glucose	20 g
Deshydrogénophosphate de potassium	0,5 g
Sulfate de magnésium	20 g
Nitrate de sodium	7,8 g
Eau distillée	1000 ml
Agar	20 g

5. Milieu P.D.A.

Extrait de pomme de terre	4 g
Glucose	20 g
Agar	16 g
Eau distillée	1000 ml
pH	4,5

2. Composition des milieux utilisés pour l'analyse microbiologique

1. Eau physiologique

Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000 ml

2. Eau peptonée

Peptone tryptique	15 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

3. Gelose nutritive	
Bouillon nutritif	1000 ml
Agar	20 g
pH	7,2 – 7,4
4. Gelose glucosée à l'oxytetracycline (OGA)	
Extrait de levures	5 g
Glucose	20 g
Agar	16 g
Oxytetracycline	1 mg/ml
Eau distillée	1000 ml
5. Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)	
Peptone	10 g
Bile déshydratée	20 g
Lactose	10 g
Solution de vert brillant à 0,133 %	10 ml
Eau distillée	1000 ml
6. Bouillon Giolitti et Cantoni	
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de lithium	5 g
Mannitol	20 g
Tween 80	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Glycine	1,2 g
Pyruvate de sodium	3 g
Eau distillée	1000 ml
7. Milieu de Chapman	
Protéose peptone	11 g
Extrait de viande	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phenol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

8. Milieu viande foie (VF)

Bouillon viande foie	1000 ml
Glucose	2 g
Sulfate de sodium	7 g
Citrate de sodium	0,5 g
Alum de fer et d'ammonium	2 g
Gelose	8 g

9. Milieu de Rothe (s/c)

Peptone	20 g
Glucose	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate bipotassique	2,7 g
Phosphate monopotassique	2,7 g
Azohydrate de sodium	0,2 g
Eau distillée	1000 ml

10. Milieu de Litsky eva (s/c)

Peptone	20 g
Glucose	5 g
Phosphate bipotassique	2,7 g
Phosphate monopotassique	2,7 g
Azohydrate de sodium	0,3 g
Ethyl violet	0,005 ml
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

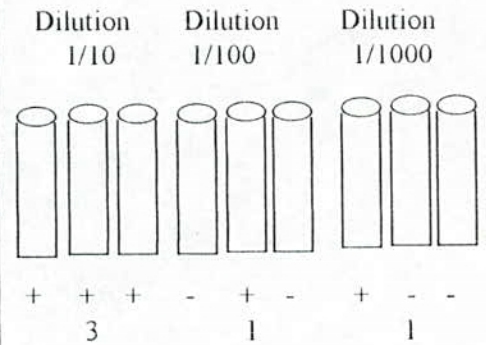
11. Réactif de Kovacs

P. diméthylamino benzaldehyde	50 g
Alcool amylique ou butylique	750 ml
Hcl pur	250 ml

3. Table pour le Calcul du Nombre le plus Probable /N.P.P.. (Afnor, 1986)

Nombre de tubes au niveau des trois dilutions successives retenues			Le coefficient NPP
1/10	1/100	1/1000	
0	0	0	<0,3
0	1	0	0,3
1	0	0	0,4
1	0	1	0,7
1	1	0	0,7
1	2	0	1,1
2	0	0	0,9
2	0	1	1,4
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	2	0	2,1
3	0	0	2
3	0	1	4
3	1	0	4
3	1	1	7
3	2	0	9
3	2	1	15
3	2	2	21
3	3	0	20
3	3	1	50
3	3	2	110
3	3	3	>110

Exemple



4. Tableau de G. Bertrand pour le dosage du Lactose

Le tableau ci-après donne directement la quantité en milligramme de lactose hydraté, en fonction du volume de la solution 0,1 N de permanganate de potassium.

K Mn O4 0,1 N	Lactose hydraté	K Mn O4 0,1 N	Lactose Hydraté	K Mn O4 0,1 N	Lactose Hydraté
5,0	23,6	9,0	43,5	13,0	64,1
5,1	24,1	9,1	44,0	13,1	64,7
5,2	24,6	9,2	44,5	13,2	65,2
5,3	25,1	9,3	45,5	13,3	65,7
5,4	25,6	9,4	45,5	13,4	66,2
5,5	26,1	9,5	46,0	13,5	66,8
5,6	26,6	9,6	46,5	13,6	67,3
5,7	27,1	9,7	47,1	13,7	67,8
5,8	27,6	9,8	47,6	13,8	68,4
5,9	28,0	9,9	48,1	13,9	68,9
6,0	28,5	10,0	48,6	14,0	69,4
6,1	29,0	10,1	49,1	14,1	69,9
6,2	29,5	10,2	49,6	14,2	70,5
6,3	30,0	10,3	50,1	14,3	71,0
6,4	30,5	10,4	50,6	14,4	71,5
6,5	31,0	10,5	51,2	14,5	72,0
6,6	31,5	10,6	51,7	14,6	72,6
6,7	32,0	10,7	52,2	14,7	73,1
6,8	32,5	10,8	52,7	14,8	73,6
6,9	33,0	10,9	53,2	14,9	74,1
7,0	33,5	11,0	53,7	15,0	74,7
7,1	34,0	11,1	54,2		
7,2	34,5	11,2	54,8		
7,3	35,0	11,3	55,3		
7,4	35,5	11,4	55,8		
7,5	36,0	11,5	56,3		
7,6	36,5	11,6	56,8		
7,7	37,0	11,7	57,4		
7,8	37,6	11,8	57,9		
7,9	38,0	11,9	58,4		
8,0	38,5	12,0	58,9		
8,1	39,0	12,1	59,9		
8,2	39,5	12,2	60,0		
8,3	40,0	12,3	60,5		
8,4	40,5	12,4	61,0		
8,5	41,0	12,5	61,5		
8,6	41,5	12,6	62,1		
8,7	42,0	12,7	62,6		
8,8	42,5	12,8	63,1		
8,9	43,0	12,9	63,6		

ملخص

تقييم اللاكتوسيروم الخام بدون تعقيم سابق بطريقة بسيطة تشمل اثراته عن طريق النمو بزرع غير متواصل لخميرة تستقلب اللاكتوز بسهولة في وجود البروتينات اللبنية، سمح لنا بالحصول على مادة مركبة من بروتينات مصلية وبروتينات خميرة ذات نوعية غذائية جيدة خالية من الممرضات، مخصصة للتغذية الحيوانية.

كلمات مفتاح: الاكتوسيروم خام - خميرة - نمو غير متواصل - تغذية الحيوانات.

Résumé

La valorisation du lactosérum brut sans stérilisation préalable par un procédé simple qui consiste à l'enrichir par la croissance en culture discontinue d'une levure métabolisant facilement le lactose en présence des lactoprotéines, a permis d'obtenir un produit composé de protéines sériques et de protéines levures de bonne qualité nutritionnelle exempte de germes pathogènes destinées à l'alimentation animale.

Mots clés: lactosérum brut- levures- culture en discontinu- lactoprotéines levurées- alimentation animale.

Abstract

Making the crude whey more valuable without any previous sterilization, by a simple enrichment process consisting on the growth in a batch fermentation of a yeast easily metabolizing the whey in presence of their proteins permitted in to obtain a good quality and nutritive product wich is a combination of proteins whey and single cell protein free from any injurious and meeting animal feeding requirements.

Keys words: crude whey - cell growth - batch process - yeast enriched whey proteins - animals feeds.