

وزارة التعليم العالي  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE - المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

1E\*

## ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

# PROJET DE FIN D'ETUDES

### SUJET

Optimisation De La Bioproduction  
De Protéines A Partir De Lacto-  
sérum

Proposé par :  
D. MAMERI

Etudié par :  
R. CHEBBINE

Dirigé par :  
D. MAMERI  
L. MAHMOUDI

PROMOTION : JUIN 1990

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
BIBLIOTHEQUE — المكتبة  
Ecole Nationale Polytechnique

ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE

DEPARTEMENT : GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

## PROJET DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DE DIPLOME D'INGENIEUR D'ETAT

SUJET

OPTIMISATION DE LA BIOPRODUCTION  
DE PROTEINES A PARTIR DE LACTOSERUM

Proposé par :

Mme D.MAMERI

Etudié par :

Melle R.CHEBBINE

Dirigé par :

Mme D.MAMERI

Mr L.MAHMOUDI

PROMOTION : Juin 1990

## Remerciements

Le présent travail a été réalisé au département génie de l'environnement sous la direction de Madame MAMERI, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour son aide et ses conseils.

Qu'il me soit permis de remercier très sincèrement Madame ABDI et de lui exprimer ma reconnaissance d'avoir bien voulu accepter de présider le jury de cette thèse

J'exprime mes profonds remerciements à Madame BOUSAID pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de participer au jury

Je tiens aussi à remercier Monsieur MAHMOUDI pour son aide et ses conseils.

المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات  
المكتبة  
BIBLIOTHEQUE  
Ecole Nationale Polytechnique

A mes parents ,mes soeurs et mes amies , je dedie ce travail

SOMMAIRE

INTRODUCTION .....

    A-Etude theorique .....

        CHAPITRE I .....

            I.1-Generalités sur le lactoserum .....

                I.1.1-Le lactoserum doux .....

                I.1.2-Le lactoserum acide .....

            I.2-Composition du lactosérum .....

                I.2.1-Composition en acides aminés essentiels .....

                I.2.2-Le lactose.....

                I.2.3-Les vitamines .....

                I.2.4-Les matières minérales .....

                I.2.5-Les matières azotées .....

            I.3-Pollution par le lactoserum .....

            I.4-Différents procédés de valorisation du lactoserum .....

                I.4.1-Methanisation du lactoserum .....

                I.4.2-Production d'alcool carburant à partir du lactoserum .....

        CHAPITRE II .....

            II.1-Procédés de production des levures.....

            II.2-Generalités sur les levures .....

            II.3-Les levures lactiques .....

            II.4-Les besoins nutritifs .....

            II.5-Conditions physico-chimiques de croissance ..

    B-Etude experimentale .....

        I-Matériels et methodes .....

            I.1-Souche utilisée .....

I.2-Fermentures et materiel utilisés .....	
I.3-Conduite de la fermentation .....	
I.3.1-Sterilisation du materiel .....	
I.3.2-Preparation de l'onoculum .....	
I.3.2.1-Composition du milieu de preculture	
I.3.2.2-Protocole experimental.....	
I.3.3-Milieu de culture et lancement de la fermentation .....	
I.3.3.1-Composition du milieu de culture	
I.3.3.2-Protocole experimental .....	
I.3.4-Mesures faites pendant et apres la fermentation .....	
I.3.4.1-La biomasse .....	
I.3.4.2-Le poids sec .....	
I.3.4.3-Dosage du lactose restant.....	
I.3.5-Cinetique de croissance en culture discontinue .....	
II-Resultats et interpretations .....	
III-Conclusion .....	
C-Annexe .....	
D-Bibliographie .....	

Liste des abreviations utilisées

- Do : Densité optique
- fig: Figure
- g : Gramme
- h : Heure
- l : Litre
- mg : Milligramme
- mn : Minute
- No : Nombre de cellules au temps  $t=0$
- N : Nombre de cellules au temps  $t$  quelconque
- nm : Nanomètre
- So : Concentration en lactose au temps  $t=0$
- S : Concentration en lactose au temps  $t$  quelconque
- t : Temps
- T : Temps de generation
- tr/mn : Tours par minute
- Xo : Biomasse au temps  $t=0$
- X : Biomasse au temps  $t$  quelconque
- Yx/s : Rendement massique
- $\mu$  : Taux de croissance

## Introduction

Pendant de nombreuses années, le traitement ou l'utilisation du lactoserum n'était pas pris en compte par les industries laitières. La pollution engendrée par une laiterie qui rejette 50000 litres de lactoserum est équivalente à celle engendrée par une ville de 25000 habitants [2]

Cette pollution est engendrée par le lactose qui représente 50% de la matière sèche du lactoserum.

Il est donc impensable de continuer à rejeter un produit qui, s'il est valorisé, peut palier aux penuries chroniques d'aliments, et aux famines que connaissent des populations entières.

En effet ni l'agriculture, ni l'élevage ou la pêche de ces pays ne peuvent fournir assez de nourriture pour assouvir les besoins de ces populations. La biotechnologie a donc orienté ses travaux vers la production de levure à partir de déchets.

La composition en protéines de ces microorganismes, permet de combler le déficit alimentaire en protéines.

L'un des microorganismes utilisés est la levure *Kluyveromyces fragilis* dont la teneur en protéines est de 50%. Celle-ci est caractérisée par sa richesse en acides gras insaturés et son taux de croissance élevé.

L'objectif de notre travail est d'optimiser le milieu de croissance de cette levure. L'optimisation portera en premier lieu sur le milieu nutritionnel et en deuxième lieu sur les conditions physicochimiques de culture.

Les expériences qui ont été réalisées ont porté sur les paramètres suivants:

- Variation de la concentration en lactose  $S_0$
- Addition de 0,03% d'urée.
- Suppression des oligoéléments.
- Suppression des extraits de levure.
- Variation du PH.
- Variation de la  $t_p$
- Aération à l'oxygène et à l'air

## CHAPITRE I

I.1-Généralites sur le lactosérum

I.2-Composition du lactosérum

I.3-Pollution par le lactoserum

I.4-Differents procedes de valorisation du lactoserum

## I.1-GENERALITES SUR LE LACTOSERUM

Le lait liquide naturel est la matière première employée pour la fabrication des fromages .La technique employée consiste à coaguler le lait ,soit par la présure qui est une enzyme extraite de la caillette de veau ,soit par l'ajout des ferments lactiques [2] [4].

La coagulation repose sur la propriété qu'a la caseine à précipiter à PH 4,6 ;la matière grasse étant une charge inerte, elle est emprisonnée dans le caillé .  
On obtient ainsi deux phases :

-Une phase solide ou caillé ,constituée par la caseine et la majorité de la matière grasse .

-Une phase liquide constituée de l'eau que contenait le lait et des substances solubles .Cette phase forme le lactosérum.

La séparation de ces deux phases se fait par égouttage ou centrifugation [2]

Le lactosérum est donc un produit dérivé du lait privé de sa caseine et de sa matière grasse ,c'est un liquide clair,de coloration jaune verdâtre ;cette couleur est due à la présence de lactoflavine (vitamine B 2 ).[5]

On distingue deux types de lactosérum.

### I.1.1-Le lactosérum doux

(Acidité > 18°D),son PH varie entre 5,9 et 6,7 ,il provient de la fabrication des fromages à pâte pressée et à pâte cuite ,il contient environ 63 à 67 g de matières sèches par litre dont 45 à 50 g de lactose , 7 à9 g de matière azotée, 6 à 9 g de matières salines , 1 à 2 g de matières grasses [1]

### I.1.2-Le lactosérum acide

(Acidité < 18°D),son PH varie entre 4,4 et 4,6 , il provient de la fabrication des fromages à pâte fraîche et à pâte molle, sa composition est très variable , il renferme moins de lactose, plus de sels minéraux (surtout calcium et phosphore), il est plus riche en acides aminés,que le lactosérum doux [3]  
(voir tableau 1.1)

Tableau 1.1  
Caracteristiques des differents types du lactosérum

	Lactosérum doux			Lactosérum acide		Lactosérum déproteiné Perméat doux d'ultrafiltration
	Pâtes pressées cuites Emmental	Pâtes pressées non cuit St-Paulin	Camembert	Pâtes fraîches	caséine	
Liquide: Extrait sec en %	6,5	5	6,5	6	6	4,5
PH	6,7	6,5	6,5	4,6	4,6	6,4
Matière sèche en%:						
Lactose	76	75	75	65,5	74	85
Proteines	13,5	13,5	13	12	12	4
Cendres	8	8,5	9	12	12	9
Acide lactique	1,8	2	2,2	10	1,8	2
Matière grasse (1)	1	1	1	0,5	0,5	0
Minéraux:						
Ca en %	0,6	0,65	0,7	1,9	1,8	0,6
P en %	0,6	0,65	0,7	1,5	1,5	0,6
Chlorures (en ClNa)	2,5	2,5	2,5	2,5	7,5	2,8

## 1.2-COMPOSITION DU LACTOSERUM

La composition du lactosérum varie selon plusieurs facteurs:

-La nature du lait qui a servi à la fabrication du fromage ,en effet le lait de vache, de brebis ou de chèvre n'a pas la même composition,d'où un lactosérum de composition différente .

-Pour la même espèce animale,la composition du lait varie suivant les caractères héréditaires,la race la saison etc ...

-Le traitement technologique dans la fabrication d'un fromage donne ,donne lieu à des variations très importantes au niveau

de la composition du lactosérum. [8]

### 1.2.1 Composition en acides aminés essentiels

Le tableau n°1.2 donne la composition en acides aminés du lactosérum (d'après M.LUQUET 1985)

Tableau n°1.2  
Composition en acides aminés essentiels  
de différentes protéines  
en g pour 100 g de protéines

	Protéi- nes de sérum	Albumine de l'oeuf	Caséine	Protéines totales du lait	Soja
Isoleucine	6,55	6,45	5,80	6,10	5,15
Leucine	14,00	8,30	9,50	10,00	7,85
Lysine	10,90	7,05	7,60	7,90	6,20
Méthionine	2,35	3,40	2,95	2,60	1,35
Cystine	3,15	2,25	0,40	1,00	1,35
Phénylanine	4,05	5,80	5,40	4,80	5,10
Tyrosine	4,80	4,05	5,70	5,20	3,40
Thréonine	6,70	5,15	4,00	4,70	4,10
Tryptophane	3,20	1,50	1,30	1,50	1,25
Valine	6,85	7,15	6,80	6,80	5,30
Total	62,55	51,10	49,45	50,60	41,50

### 1.2.2-Le lactose

C'est le principal constituant en poids de l'extrait sec du lait et en représente 69 à 75 % [2][4]

C'est un sucre réducteur de formule brute  $C_{12}H_{22}O_{11}$ , il appartient au groupe des diholosides. C'est le  $\beta$  galactoside, 1-4 glucose [7].

Il est formé par l'union d'une molécule de  $\beta$  galactose et d'une molécule de glucose  $\alpha$  ou  $\beta$ , d'où l'on obtient deux isomères qui sont:

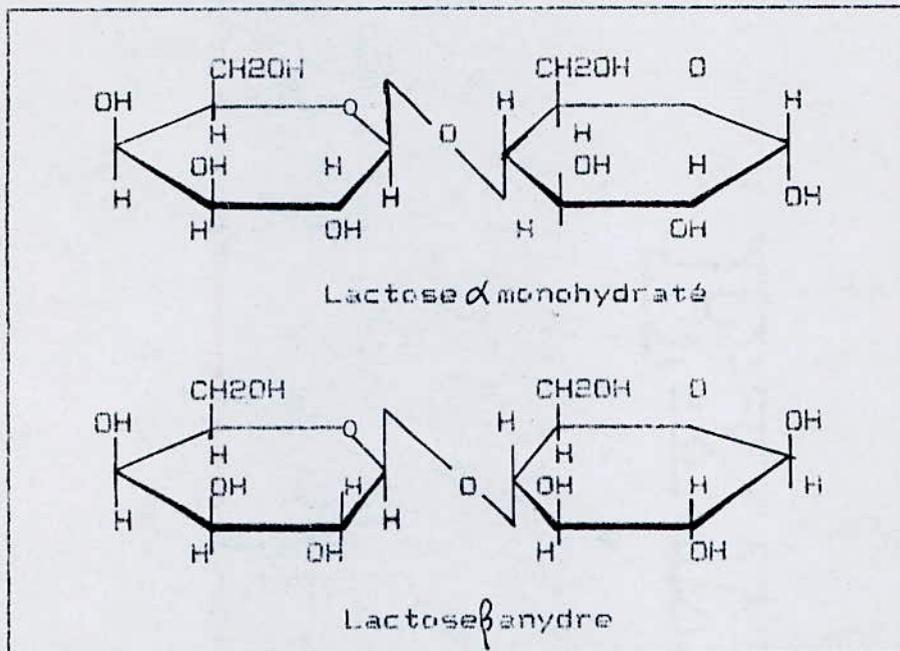
1-La forme  $\beta$  anhydre dont les propriétés sont les suivantes:

Pouvoir rotatoire  $+35^\circ$ , solubilité pour 100 ml d'eau à  $20^\circ C$ : 55 g.

2-La forme  $\alpha$  monohydraté: c'est la forme commerciale normale, ses propriétés sont les suivantes:

Pouvoir rotatoire  $+89,5^\circ$ ; solubilité pour 100 ml d'eau à  $20^\circ\text{C}$ : 5 g

La formule développée du lactose est la suivante:



### 1.2.3-Les vitamines

Les vitamines du lactosérum sont en majorité des vitamines hydrosolubles (vitamines B&C); les vitamines liposolubles (vitamines A, D&E) ont été entraînées par les matières grasses qui a été presque totalement éliminée. [8]

Parmi les vitamines présentes, on note des quantités importantes de riboflavine (B2), d'acide pantothénique, de thiamine (B1), de pyridoxine (B6) et de vitamine C.

Le tableau n°1.3 donne la composition vitaminique du lactosérum suivant le lait dont il provient.

Tableau 1.3 Composition vitaminique de 3 sérums en relation avec le lait d'origine en ug/100 g

	Emmental		Gruyere		Tilsit	
	Lait	Sérum	lait	Sérum	lait	Sérum
Thiamine B1	47	38	41	39	42	38
Riboflavine B2	186	137	233	186	262	157
Pyridoxine	34	44	60	43	44	39
Cobalamine B12	0,38	0,22	0,33	0,27	0,32	0,27
Pantothénate de calcium	281	385	426	461	280	432
Biotine	1,7	1,8	1,1	1,7	1,4	1,6
Vitamine C	440	203	358	230	600	260

#### 1.2.4-LES MATIERES MINERALES

Leur teneur varie de 6 à 8 g de la matière sèche du lactosérum. Elles se trouvent sous forme de sels, chlorures, sulfates, citrates et bicarbonates. [2][11]  
Le tableau n°1.4 donne les différents éléments présents et leurs proportions

Tableau n°1.4  
Composition des laits en minéraux et en acide citrique

	Dans le lait de vache			
	Valeurs extrêmes	Sérum	p.100 Soluble	Molarité moyenne
Potassium..... (K <sub>2</sub> O)	1,2 (1,5) 1,8 (2,2)	1,68	100	0,04
Sodium..... (Na <sub>2</sub> O)	0,35(0,47) 1,1 (1,5)	0,53	100	0,02
Calcium..... (CaO)	0,9 (1,3) 1,6 (2,2)	0,48	35	0,032
Magnésium..... (MgO)		0,09	60	0,005
Phosphore..... (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,75(1,7) 1,25(2,9)	0,53	50	0,032
Chlore..... (NaCl)	0,7 (1,1) 1,15(2,7)	1,17	100	0,03
Soufre.....				
Acide citrique.....	1,2-2,2			0,01
Cendres.....				

#### 1.2.5-LES MATIERES AZOTEES

##### 1-La matière azotée protéique

Les protéines du lactosérum représentent 17 % de la matière azotée totale du lait de vache; il s'agit de l'ensemble des matières protéiques qui ne précipitent pas au point isoélectrique (PH=4,6) de la caseine. [4]

Elles sont caractérisées par leur excellente <sup>valeur</sup> nutritionnelle qui découle d'une composition en acides aminés riches, (tableau I.2), caractérisée par une teneur en lysine élevée; sa teneur dans la B lactoglobuline est de 11 % et dans la lactalbumine, elle est de 10 à 11 % [1]

Le tableau n° I.5 donne les principales protéines du lactosérum, leur solubilité, leur mobilité électrophorétique et leur origine.

Tableau n° I.5  
Les principales protéines du lactosérum de vache

Groupe	%	Caractère de solubilité			
		(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1/2 sat.	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 12%	TCA 4%	Chauffage 100°
Protéose péptone PP	19	Sol.	Insol.	Sol.	Sol.
Globuline (G)...	13	Insol.	Sol.	Inso	Insol.
Albumines (A)...	68	Sol.	Sol.	Inso	Insol.
		Constituants électrophorétique (1)		Mobilité	Origine
		N°			
G	13,0	1 euglobuline		-1,7	sanguine
G	"	2 pseudoglobuline		-2,4	sanguine
PP	4,6	3 composant III		-2,8	(?)
A	19,7	4 lactalbumine		-3,0	mammaire
PP	8,6	5 composant V		-4,5	(?)
A	43,7	6 lactoglobuline		-4,9	mammaire
A	4,7	7 séralbumine		-6,5	sanguine
PP	5,7	8 composant VIII		-7,8	(?)

Mobilités à PH force ionique 0,1.

## 2- Les matières azotées non protéiques

La composition et la teneur varient suivant les espèces, dans le lait de vache, les proportions varient entre 1,1 et 2,9 g/l. Le constituant majeur est l'urée avec une teneur de 0,25 g/l, on note aussi la présence d'acides aminés libres dont le plus abondant est l'acide glutamique: 30 à 50 mg/l, la lysine, glycine, valine existent à des teneurs variant de 5 à 10 mg/l chacune 4.

### 1.3-POLLUTION PAR LE LACTOSERUM

Le lactosérum ne contient pas des éléments toxiques qui puissent nuire à la faune ou à la flore, donc en tant que produit il n'est pas polluant, mais quand il est déversé dans une rivière, il engendre des effets polluants.

En effet le lactosérum contient des éléments comme le lactose qui peut servir de substrat aux microorganismes, provoquant ainsi, la consommation de l'oxygène de l'eau, d'où il y a phénomène d'eutrophisation. [8]

La gravité de la pollution due au lactosérum, tient au fait qu'il a une très forte D B O, elle varie entre 30000 et 45000 mg d'oxygène par litre de lactosérum, et chaque litre de lactosérum déversé nécessite l'oxygène de 4500 litres d'eau non polluée. [2][5]

Sachant qu'en algérie la quantité de lait utilisée pour la fabrication du fromage est de 160000 l/j (d'après ORLAC 1989), et sachant que le lactosérum rejeté représente environ 80 % de la quantité de lait utilisée, soit un volume de 128000 l/J de lactosérum rejeté, et un volume d'eau de rivière polluée de :

$$128000 \times 4500 = 5,76 \cdot 10^8 \quad \text{l/J} = 576000 \text{ m}^3/\text{J}$$

Il apparaît donc nécessaire d'interdire le rejet dans les rivières, sans traitement préalable de ce produit.

### 1.4-DIFFERENTS PROCÉDES DE VALORISATION DU LACTOSERUM DEJA EXISTANTS

Différents procédés ont été proposés pour essayer de traiter et de valoriser le lactosérum ; deux procédés seront dans ce qui suit détaillés :

#### 1.4.1-METHANISATION DU LACTOSERUM (6)

La valorisation du lactosérum, se heurte à trois types de problèmes : géographiques, techniques et économiques. En effet l'acheminement du lactosérum vers des unités de transformation industrielle est très coûteux, d'où la nécessité de le valoriser sur place, et la recherche d'une économie d'énergie d'une part, et la solution au problème de pollution d'autre part, a conduit l'institut technique du gruyère à faire une étude sur la méthanisation du lactosérum et ceci depuis 1978.

Il s'agit de la biodégradation des molécules organiques en anaérobiose, conduisant à la production de deux gaz : le méthane et le gaz carbonique.

cette biodégradation se déroule en quatre phases (voir fig 1.2) elle est assurée par des boues provenant d'un digesteur urbain. Le fermenteur est alimenté eu semi continu, il reçoit d'un côté le lactosérum et produit de l'autre côté une quantité équivalente d'effluent épuré, du méthane et du gaz carbonique. Le procédé de fabrication du méthanol est représenté par la fig n°1.1

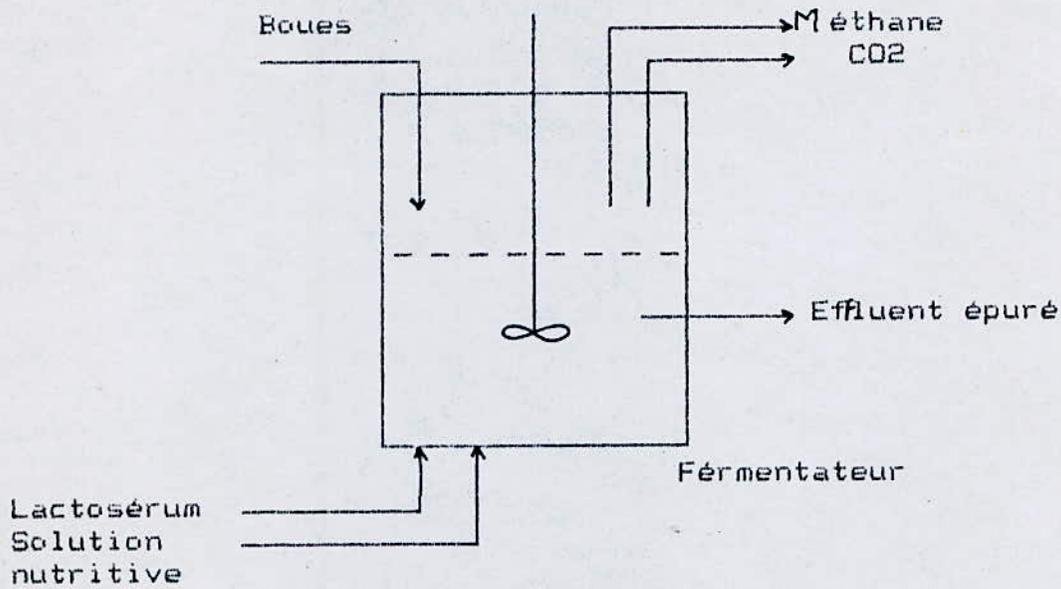


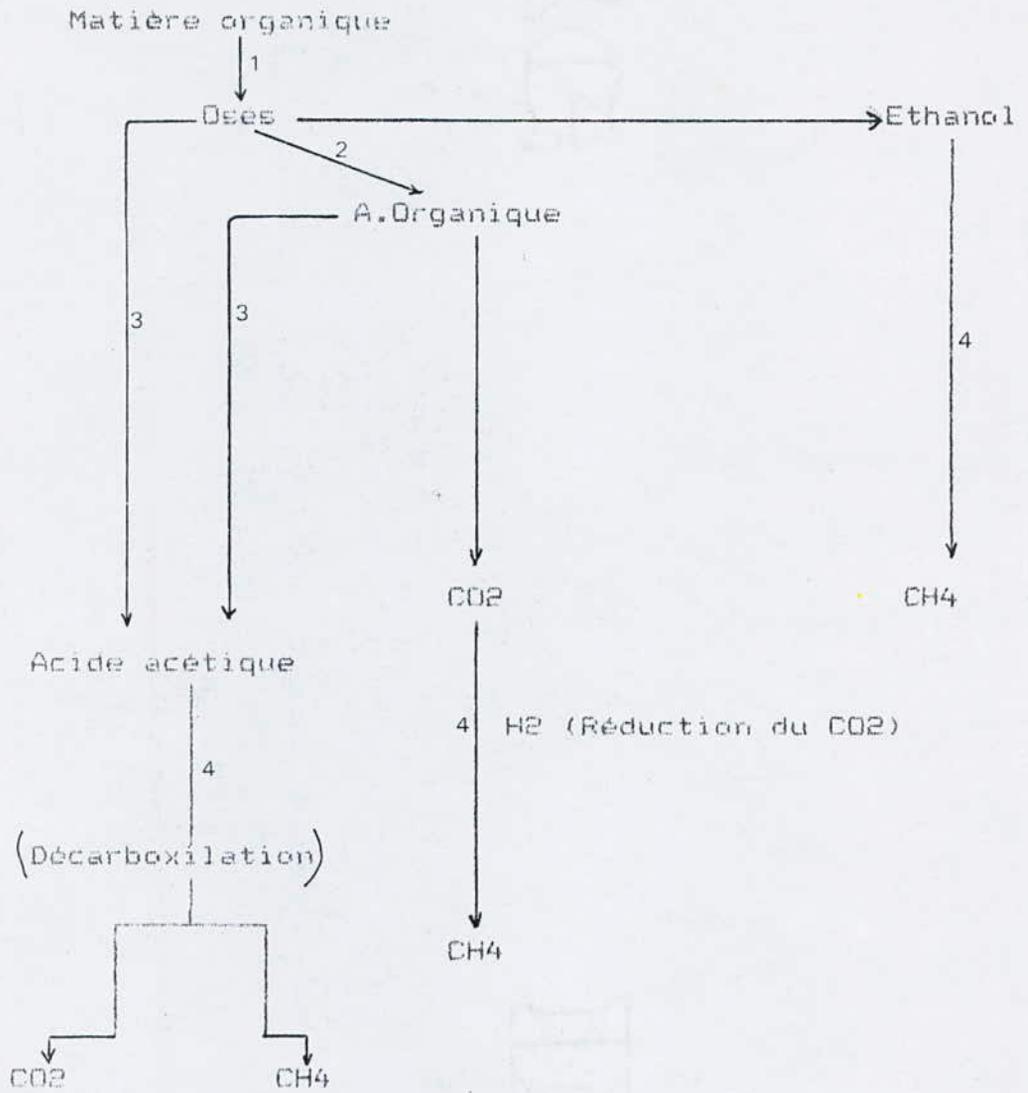
Fig n°I.1: Diagramme de fabrication du méthanol

A l'échelle laboratoire les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau n°I.6

Tableau n°I.6: Taux de transformation du lactosérum en méthane

Constituants du lactosérum	Concentration g/l	Production biogaz l/g	Production de biogaz/l (sérum)	% CH <sub>4</sub>
Lactose	48	0,75	36	50%
Protéines	7,5	0,98	7,5	50%
Minéraux	5,5	-	-	-

L'efficacité d'épuration du fermenteur est supérieure à 90% (voir fig 1.3).  
Les boues produites sont épandues sur des terrains agricoles.



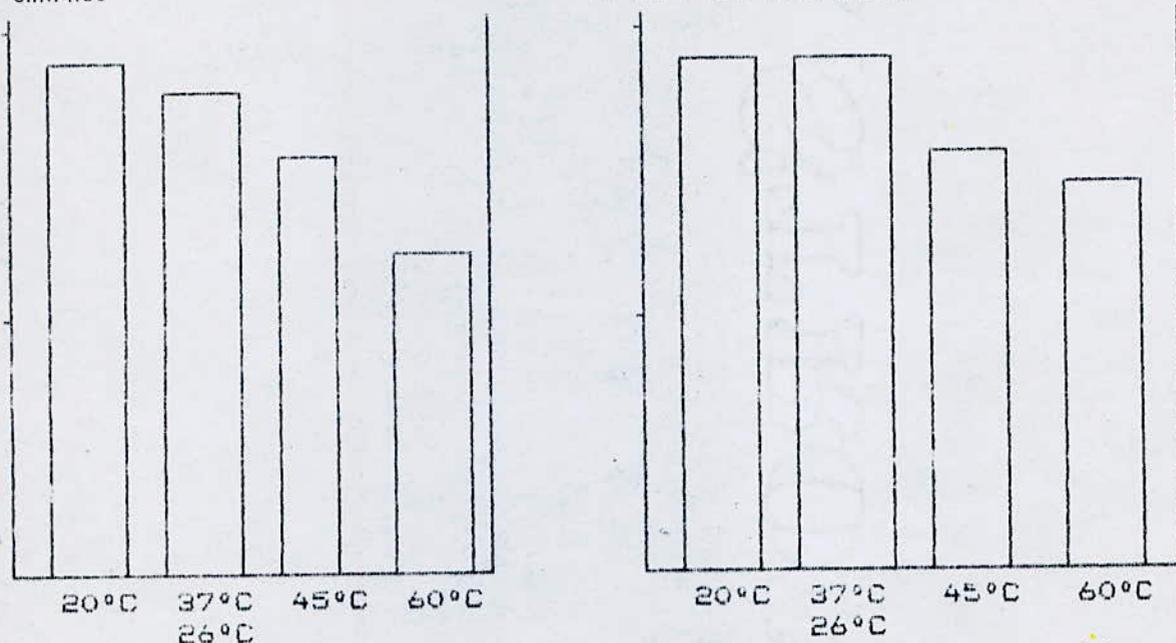
(1) phase d'hydrolyse  
 (3) phase acétogène

(2) phase acidogène  
 (4) phase méthanogène

figI.2 : Les différentes phases de méthanisation du lactosérum

DCO éliminée

% de DBO éliminée



figI.3-Pourcentage de DBO et DCO éliminées par méthanisation du lactosérum

#### 1.4.2: PRODUCTION D'ALCOOL CARBURANT A PARTIR DU LACTOSERUM<sup>9</sup>

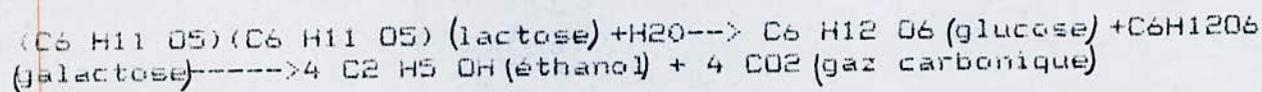
L'alcool produit à partir du lactosérum est destiné à être mélangé à de l'essence et sert de carburant.

Le procédé repose sur trois techniques : ultrafiltration, fermentation et distillation.

Avant la fermentation le lactosérum est soumis à :

- Une décantation centrifuge en vue de le débarrasser de matières en suspension telles que la caseine et le sable
- Une pasteurisation à 72°C pour éviter la prolifération bactérienne.

Après pasteurisation le lactosérum est déprotéiné par ultrafiltration sur membranes minérales : Le rétentat riche en protéines est soumis à une concentration et un séchage, et est commercialisé comme aliment pour bétail. L'ultrafiltrat riche en lactose sert de substrat de fermentation suivant la réaction :



Les souches utilisées sont soit *Candida pseudotropicalis*, soit *Kluyveromyces fragilis*. La fermentation est conduite en anaérobiose.

Après fermentation ,les levures sont récupérées par décantation centrifuge,une partie sert à l'ensemencement initial,ce qui permet de réduire la durée de fermentation .Le surnageant est soumis à une distillation qui donne un alcool à une concentration de 96°.

Le résidu de la distillation est soumis à une méthanisation .  
La fig n°I.4 schématise le procédé de fabrication de l'alcool carburant sur le lactosérum.

Les résultats donnés par ce procédé sont regroupés dans le tableau suivant :(n°I.7)

tableau n°I.7:

Tonnages et volumes des produits donnés par le procédé

Production	Lactosérum (Tonnes)	Lactosérum surprotéiné (Tonnes)	Levures (Tonnes)	Alcool (hl)
Marche n°1	14,3	11,7	0,8	167
Marche n°2	0	15,5	1,1	220

Matière première: 1000000 l de lactosérum (60 tonnes de matière sèche)

## CHAPITRE II

II.1-Procédé de production des levures

II.2-Generalités sur les levures

II.3-Les levures lactiques

II.4-Les besoins nutritifs

II.5-Conditions physico-chimiques de croissance

II.2-GENERALITES SUR LES LEVURES :Les levures sont des champignons microscopiques qui appartiennent au règne des protistes encaryotes. [11]

Ce sont des organismes principalement glucidolytiques, ils ont une grande affinité pour les glucides à faible poids moléculaire tels que le glucose, fructose, gactose, saccharose, maltose et lactose. [12]

Les cellules sont caractérisées par un état unicellulaire, leur forme est variable suivant le genre auquel elles appartiennent. Les cellules peuvent être :

- Ovoïdes:ex *Saccharomyces cerevisiae*
- Sphériques :ex *Saccaromyces lactis*
- Rectangulaires:ex *Saccharamyces pastorianus*

Les dimensions des cellules sont très variables, elles peuvent aller de 1 à 5 um de largeur et de 5 à 50 um de longueur. les cellules sont aussi caractérisées par leur imobilité due l'absence de flagelle [13] [14].

La reproduction se fait selon deux modes principaux:

a-Reproduction par bourgeonnement:C'est le mode de reproduction le plus courant chez les levures, c'est un processus asexué au cours duquel, la cellule mère émet une petite excroissance en forme de bourgeon, auquel elle cède une partie du matériel cytoplasmique et nucléaire.

Quand le bourgeon, égale en taille, la cellule mère, il s'en sépare par formation d'une cloison. [14]

b-Reproduction par scission:Il y a formation d'un septum divisant la cellule mère en deux cellules, sans aucune constriction de la paroi cellulaire. (15)

Les levures se classent dans trois grandes familles (d'après GIRARD, ROUGIEUX 1967)

1-Les sporolobolomycetaceae:Ce sont des levures à métabolisme oxydatif, elles se rencontrent sur les grains humides, les farines et les matières végétales en décomposition. Quand le milieu de culture s'appauvrit, elles forment des spores externes qui sont projetées à maturité, loin de la cellule mère.

2-les cryptococaceae:Ce sont des levures à métabolisme oxydatif ou fermentaire. Le mode de reproduction est le bourgeonnement. Les levures appartenant à cette famille ne forment jamais de spores.

3-Les endomycetaceae:Le métabolisme est oxydatif ou fermentaire, le mode de reproduction est le bourgeonnement. Les cellules sont capables de former des spores internes appelées ascospores.

## II.3-LES LEVURES LACTIQUES

Elles appartiennent à la classe des ascomycetes, elles sont capables d'utiliser le lactose comme source d'hydrate de carbone.

Parmi ces levures, *Kluyveromyces fragilis* est très employée, elle appartient à la classe des ascomycetes, famille des endomycetaceae, genre sacchoromyces.

Les levures lactiques sont caractérisées par leur richesse en:

- Acides aminés (voir tableau n°II.2)
  - Acide ribonucléique(voir tableau n°II.1)
  - Acide gras (voir tableau n°II.3)
  - Vitamines B et C (voir tableau n°II.4)
  - Acide glutamique ou glutation (voir tableau n°II .1)
- Kluyveromyces fragilis* est caractérisée par :

- Un taux de croissance élevé.
- Teneur en protéines élevée.
- Capacité de production de galactosidase permettant l'hydrolyse du substrat (lactose) (voir tableau n°II.5)

La composition des levures lactiques est donné par le tableau n°II.1 (d'après DELAGUERVIERE 1981).

Tableau n°II.1  
LEVURE LACTIQUE

Composition analytique globale moyenne (g/100 g)	
Humidité.....	4,5
Matière protéique (N*6,25) (dont ARN+ADN:6).....	50,0
Glucides.....	30,3
Lipides .....	6,0
Minéraux.....	8,1
Choline.....	0,5
Glutathion.....	0,5
Vitamines groupe B.....	0,07
Vitamine C.....	0,06
Industries alimentaires et agricoles 1981	

Tableau n°II.2  
Acides aminés exprimés en g/100 g de levure aliment.  
Valeurs moyennes (acides aminés essentiels en gras)

NATURE	
Acide aspartique + asparagine.....	4,3
Thréonine.....	2,2
Sérine.....	2,6
Acide glutamique + glutamine.....	8,3
Proline.....	1,5
Glycine.....	1,9
Cystine + cystéine.....	0,5
Valine.....	2,2
Méthionine.....	0,8
Isoleucine.....	2,0
Leucine.....	3,3
Tyrosine.....	1,5
Phénylalanine.....	1,5
Histidine.....	1,0
Lysine.....	3,5
Arginine.....	2,5
Tryptophane.....	0,6

Tableau n°II.3

LEVURE LACTIQUE  
Fraction lipidique (en mg/100 g de levure aliment )  
(valeurs moyennes)

ACIDES GRAS		
Butyrique.....	C 4	10
Laurique.....	C 12	5
Myristique.....	C 14	30
Pentadécanoïque.....	C 15	20
Palmitique.....	C 16	575
Palmitoléique.....	C' 16	180
Heptadécanoïque.....	C 17	50
Stéarique.....	C 18	85
Oléique.....	C' 18	995
Linoléique.....	C' 18	705
Linoléinique.....	C' 18	250
Arachidonique.....	C 20	5
Gadoléique.....	C' 20	5

Tableau n° II.4

LEVURE LACTIQUE  
Répartition des vitamines en mg/100 g de levure aliment  
Valeurs moyennes

Vitamines hydrosolubles		
B 1 (Thiamine).....	1,0	à 1,5
B 2 ( Riboflavine ).....	2,5	à 5,0
B 3 ou PP (Nicotinamide).....	35,0	à 45,0
B 5 (Acide pantothenique).....	8,0	à 15,0
B 6 (Pyridoxine).....	0,8	à 1,2
B 8 ou H ( Biotine ).....	0,04	à 0,09
B C ( Acide folique ).....	1,8	à 2,0
B 12 (Cobalamine).....	0,0005	à 0,0015
C ( Acide ascorbique vrai ).....	65,0	à 75,0
Vitamine liposoluble		
E (Tocophérol).....	25,0	à 45,0

Tableau n° II.5  
Assimilation et fermentation des glucides  
par les levures du genre saccharomyces

Espèce	Lactis	Fragilis	Uvarum	Cerevisiae	Pastorianus	Dviformis	Chevalieri	Marxianus
A	+	+	-	-	-	-	-	+f
F	+	+	-	-	-	-	-	-

A:Assimilation  
F:Fermentation

+ Positif  
- Negatif

+f Positif , faible  
ou lent

#### II.4-BESOINS NUTRITIFS

Pour assurer la croissance ,la reproduction et la biosynthèse des métabolites nécessaires à la survie,les levures ont besoin d'un apport d'aliments qu'elles dégradent pour synthétiser leurs constituants organiques.

Les réactions enzymatiques assurant la dégradation du substrat libèrent l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire.  
Pour cela les levures ont besoin de:

1-Une source de carbone: Qui est pour kluyveromyces fragilis le lactose, la B galactosidase l'hydrolyse en galactose et glucose plus facilement dégradable par la cellule.

## 2-Une source d'azote:

Toutes les levures sont capables d'assimiler l'azote ammiacal, elles sont aussi capables d'assimiler l'azote organique apporté sous forme d'acides aminés. L'azote permet la synthèse des protéines de la cellule, qui représentent environ 50 % du poids sec.

## 3-Une source d'éléments minéraux et oligo-éléments :

Les éléments minéraux jouent un rôle dans les réactions de synthèse des constituants de la cellule.

Parmi ces éléments :

\*-Le phosphore : Il joue un rôle dans les réactions de synthèse des protéines et des acides nucléiques, il est ajouté au milieu sous forme de phosphates.

\*-Le soufre : Il joue un rôle dans la synthèse de la méthionine, il est ajouté au milieu sous forme de sulfates.

\*-Le magnésium: Favorise le contrôle du PH intracellulaire, et augmente la résistance des levures aux ions toxiques.

\*-Le magnésium : Il est responsable de la fixation des enzymes sur le substrat.

D'autres éléments sont aussi indispensables à la levure comme le manganèse, le calcium, le zinc et le fer.

Les oligo-éléments sont indispensables en quantités très petites, ils jouent le rôle d'activateurs enzymatiques, ce sont le cuivre, le cobalt, le molybdène, le bore et l'iode.

4-Une source de vitamines: Les levures sont incapables de synthétiser certaines vitamines qui jouent le rôle de facteurs de croissance, elles sont donc ajoutées au milieu de culture sous forme d'extraits de levures contenant toutes les vitamines nécessaires à la croissance de la levure. [1]

## II.5-CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE CROISSANCE

1-La température: La température optimale de croissance des levures est comprise entre 28 et 35°C, à partir de 40°C la température maximale de croissance est atteinte ou dépassée et la destruction thermique peut déjà avoir lieu. [11]

2-Le PH : Les levures tolèrent de très larges gammes de PH. Elles poussent bien à des PH compris entre 3 & 7, ceci est dû à

l'effet tampon que présente le cytoplasme cellulaire dont le PH ne varie qu'entre 5,3 et 6,3 ; cette stabilité du PH est due à l'action du magnésium qui joue un rôle dans le contrôle du PH intracellulaire, et à l'imperméabilité de l'enveloppe cellulaire aux ions  $H^+$  et  $OH^-$ .

3-L'oxygène: Au cours de la fermentation, l'oxygène joue un rôle dans le métabolisme cellulaire, en effet il est indispensable à la synthèse des lipides des stérols et des acides gras insaturés.

## I-MATERIELS ET METHODES

### I.1-Souche utilisée:

La levure utilisée dans les expériences qui ont été réalisées est *Kluyveromyces fragilis*. Elle est entretenue dans des tubes de gélose inclinée. Un repiquage trimestriel permet de renouveler le milieu et de maintenir la vitalité des cellules.

La préparation du milieu gélosé de fait comme suit :

- 1-On pèse 1,9 de gélose nutritive Bacto Yeast Malt Difco 07700.
- 2-On dilue la gélose dans 50 ml d'eau, la solution est homogénéisée par un chauffage à 80°C dans un thermostaté pendant 10 mn
- 3-La solution obtenue est répartie dans 5 tubes à essai à raison de 10 ml par tube.
- 4-Les tubes bouchés par du coton sont stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 mn. Après ceci ils sont refroidis à température ambiante en position inclinée.
- 5-Après solidification de la gélose, on ensemence stérilement à proximité d'une flamme, et en stries les tubes.
- 6-Les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures.
- 7-Les souches seront après cela conservées à 4°C et serviront à l'ensemencement de l'inoculum.

### I.2-Fermenteurs et matériel utilisés:

Le matériel utilisé se compose de :

- Un fermenteur de 75 ml pour la préculture
- Un fermenteur de 120 ml pour la culture
- Quinze pipettes de 1 ml pour les prélèvements
- Deux réfrigérants
- Une pipette de 10 ml pour l'ensemencement
- Une burette
- Deux diffuseurs d'air avec filtres
- Un PH mètre
- Une centrifugeuse
- Un bain-marie
- Un thermomètre
- Deux barreaux magnétiques
- Une plaque d'agitation

### I.3-CONDUITE DE LA FERMENTATION

La conduite d'une fermentation se déroule suivant les étapes suivantes:

### I.3.1-La stérilisation du matériel

La stérilité doit être obtenue pour le matériel en contact avec les levures, c'est à dire les fermenteurs, les pipettes de prélèvement et d'ensemencement et les diffuseurs d'air.

Elle doit l'être aussi pour les milieux de culture et pour l'ensemble des substances entrantes : L'air et la base neutralisante [20]

La stérilisation se fait à l'autoclave à 120°C pendant 20mn après avoir chargé les fermenteurs et bouché les orifices avec du coton qu'on recouvre de papier aluminium.

La sonde du PH mètre est stérilisée par immersion dans de l'eau oxygénée pendant 10 mn puis elle est rincée à l'eau brillante.

### I.3.2-PREPARATION DE L'INOCULUM

La veille de chaque fermentation, on procède à la préparation de la préculture qui servira d'inoculum pour le milieu de culture.

#### I.3.2.1-COMPOSITION DU MILIEU DE PRECULTURE [21]

Le milieu de préculture est composé de :

- NH<sub>4</sub>CL: 7,63 g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,81 g/l
- Extraits de levures: BIODKAR112002:1g/l
- Lactose
- Solution d'oligo-éléments (\*):1 ml/l
- Solution de métaux (\*):10 ml/l

La concentration du lactose varie suivant les conditions de fermentation étudiées. Nous donnerons cette concentration dans chaque cas, ainsi que la température et le PH du milieu.

En dégradant le lactose, les levures produisent de l'acide qui tend à baisser le PH du milieu et vu qu'il n'était pas possible de l'ajuster pendant la nuit, nous avons utilisé une solution tampon composée de

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Acide citrique

La concentration de ces produits varie en fonction du PH que l'on désire obtenir. le tableau I.1 donne les valeurs de ces concentrations en fonction du PH. (d'après ALEXEEV 1980)

(\*) Voir composition en annexe

Tableau 1.1: Concentrations de l'acide citrique et du Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en fonction du PH

PH	Acide citrique (g/l)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/l)
3,0	16,69	5,83
3,5	14,24	9,14
4,0	12,91	10,94
4,5	11,19	13,27
5,0	10,19	14,62

### 1.3.2.2-PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les produits mentionnés dans le paragraphe 1.3.2.1 sont dissous dans 70 ml d'eau. On charge le fermenteur avec cette solution et on met en place le dispositif suivant:

- Dispositif d'aération formé d'un diffuseur d'air et d'un filtre à air.
- Un barreau magnétique
- Un réfrigérant qui limite l'évaporation du milieu

Les orifices restants sont bouchés par du coton qu'on recouvre de papier aluminium et l'ensemble est porté à la stérilisation à 120° C pendant 20 mn

Après refroidissement du fermenteur on procède aux opérations suivantes :

- 1-On met le fermenteur sur une plaque d'agitation dont on règle la vitesse .
- 2-On branche l'aérateur.
- 3-On branche le bain thermostaté qui maintient le milieu à la température désirée .
- 4-On ensemence stérilement ,en prélevant à l'anse, à proximité d'une flamme ,des cellules de levures ,maintenue en vie sur gélose inclinée et qu'on met dans le fermenteur

La préculture est laissée ainsi jusqu'au lendemain c'est à dire 16 heures de préculture où elle servira d'inoculum pour la culture .

### 1.3.3-MILIEU DE CULTURE ET LANCEMENT DE LA FERMENTATION

#### 1.3.3.1-COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE

Le milieu de culture est composé des mêmes produits et aux mêmes concentrations que le milieu de préculture ,mais pour la culture on ne tamponne pas le milieu ,le PH étant ajusté manuellement par addition de soude 0,2 N stérile contenue dans une burette reliée directement au fermenteur (voir fig 11)

Legende:

1-Réfrigérant

2-Thermomètre

3-PH mètre

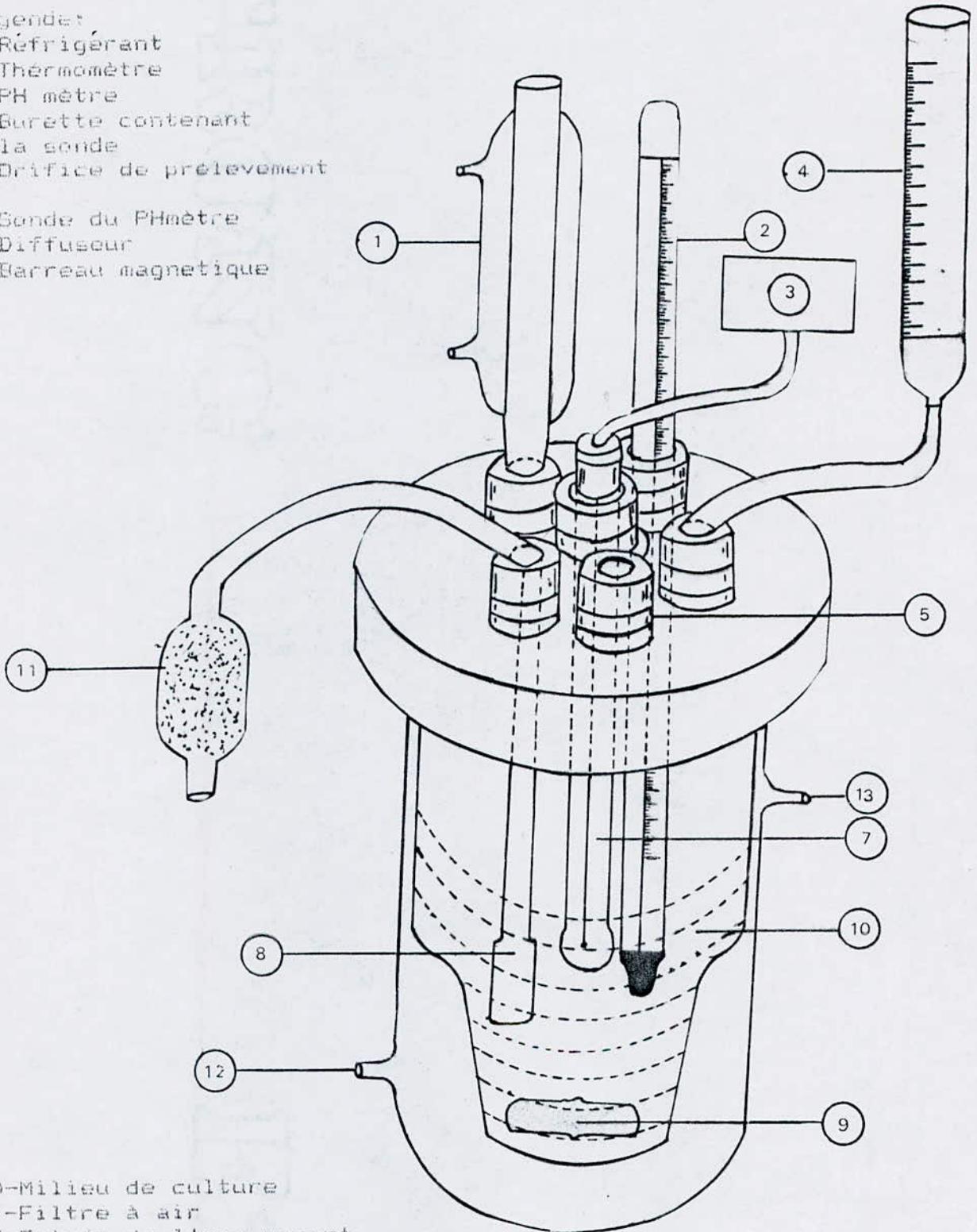
4-Burette contenant  
la sonde

5-Orifice de prélèvement

7-Sonde du PHmètre

8-Diffuseur

9-Barreau magnetique



10-Milieu de culture

11-Filtre à air

12-Entrée de l'eau venant  
du bain thermostaté

13-Sortie de l'eau

Fig I.1-Schéma du dispositif de fermentation utilisé

### 1.3.3.2-LANCEMENT DE LA FERMENTATION

La préparation du milieu de culture se fait comme suit :

1-Les produits mentionnés au paragraphe 1.3.2.1 sont dissous dans dans 120 ml d'eau.

2-On ajuste le PH du milieu de culture par addition d'acide sulfurique jusqu'à la valeur désirée .

3-On charge le fermenteur ,qui reçoit le dispositif d'aération dispositif de réfrigération,le barreau magnétique le tuyau reliant la burette au fermenteur et le thermomètre.

4-L'ensemble est porté à l'autoclave à 120 °C pendant 20 mn.

5-Apres refroidissement du fermenteur on le met sur une plaque d'agitation dont on règle la vitesse d'agitation.

6-On branche le fermenteur au bain thermostaté qui amene le milieu à la température désirée.

7-On met en place la sonde du PH mètre préalablement stérilisée à l'eau oxygénée.

8-On ensemeince le milieu en prélevant stérilement,à proximité d'une flamme ,10 ml de la préculture ,et qu'on ajoute à la culture.

### 1.3.4-MESURES FAITES PENDANT ET APRES LA FERMENTATION

#### 1.3.4.1-LA BIOMASSE

A partir du temps  $t=0$  et toutes les 30 mn ,on réalise un prélèvement de 1 ml du milieu de culture,l'échantillon est ensuite dilué dans l'eau distillée .

Le rapport de dilution va de 1/4 au début de la fermentation au 1/50 à la fin,et ceci pour rester dans l'intervalle d'absorbance 0-1 .

L'échantillon est ensuite passé au spectrophotomètre ,où on lit la densité optique à 500 nm .

#### 1.3.4.2-LE POIDS SEC

Après 7 heures de culture ,on arrête la fermentation .On prélève 20 ml du jus de fermentation et on les centrifuge à 3000 tr/mn pendant 15mn .

Le surnageant est recuperé pour doser le lactose restant .

Le culot de levure est lavé une première fois en lui ajoutant 20 ml d'eau distillée,on agite pour resuspendre les levures et on centrifuge encore à 3000tr/mn pendant 15 mn.

On jette le surnageant ,et on recommence l'opération de lavage une deuxième fois .

Le culot est ensuite séché à 105 °C pendant 16 heures, après on pèse le poids sec obtenu x c'est à dire la biomasse.

La courbe d'étalonnage qui donne la biomasse x en fonction de la densité optique, obtenue en traçant la droite passant par l'origine et par le point (x, DOx) où DOx représente la densité optique de l'échantillon à t=7 heures.

#### I.3.4.3-DOSAGE DU LACTOSE RESTANT:

Le lactose est dosé colorimétriquement par la méthode phénol-acide sulfurique dont le principe consiste à déshydrater le sucre par de l'acide sulfurique et le transformer en son furfural dérivé qui se condense à son tour avec le phénol et donne une coloration jaune-orange mesurable au voisinage de 488 nm.[17]

Les réactifs utilisés sont :

- H2SO4 pur
- Solution phénol à 5 % dans l'eau distillée .
- Solution de lactose à 25 mg/ml

La solution de lactose permet de préparer une gamme de solutions étalons allant de 0 (blanc) à 5 mg/ml

Le protocole expérimental est le suivant:

- 1-On prend 1 ml de la solution à doser
- 2-On lui ajoute 1 ml de solution de phénol, on agite la solution énergiquement .
- 3-On ajoute 1 ml d'acide sulfurique et on agite énergiquement .
- 4-On attend 5 mn avant de mettre les tubes dans un bain thermostaté à 30° C pendant 20 mn .
- 5-On lit sur spectrophotomètre la densité optique à 488 nm .

On trace la courbe d'étalonnage donnant la densité optique en fonction de la concentration en lactose .Fig (I.2)  
On lira pour les autres échantillons, la concentration en lactose sur cette courbe.

#### II.3.5-CINETIQUE DE CROISSANCE EN CULTURE DISCONTINUE:

La croissance cellulaire se fait par divisions successives, le temps de génération T est le temps du bout duquel la cellule mère donne deux cellules filles .Il est fonction des conditions physico-chimiques dans lesquelles sont placées les cellules.

Soit N le nombre de cellules au temps t  
NO le nombre de cellules au temps t=0

En supposant que T est constant on peut écrire

$$N = NO \cdot 2^{\frac{t}{T}}$$

En passant aux logarithmes népériens

$$\ln(N/NO) = (t/T) \ln 2$$

Avec  $\ln 2/T = \mu$  taux de croissance exprimé en  $\text{hexp}(-1)$   
d'où :

$$\ln(N/N_0) = \mu t$$

En dérivant on obtient  $dN/N = \mu dt$  ( $N_0 = \text{constante}$ )

soit  $dN/dt = \mu N$

sachant que  $N = X \cdot V$

Avec X: Biomasse exprimée en g/l

V: Volume exprimé en litres

d'où  $d(XV)/dt = \mu XV$

En dérivant on obtient

$$VdX/dt + XdV/dt = \mu XV$$

Le volume étant constant :  $dV/dt = 0$   $dX/Xdt = \mu$   $D \ln X / dt = \mu$

En phase exponentielle  $\mu = \mu_{\max}$

$$X = X_0 e^{(\mu_{\max} t)}$$

La croissance cellulaire se faisant au détriment des divers substrats : sucre, source d'azote, on définit le rendement massique de production de microorganismes comme suit:

$$Y (X/S) = -dX/dS = -(X - X_0)/(S - S_0) = (X - X_0)/(S_0 - S) \\ = X_0(\exp(\mu_{\max} t) - 1)/(S_0 - S)$$

$Y (X/S) = X_0(\exp(\mu_{\max} t) - 1)/(S_0 - S)$

Avec Y X/S : Rendement de production de microorganismes par consommation du substrat S

X: Biomasse g/l

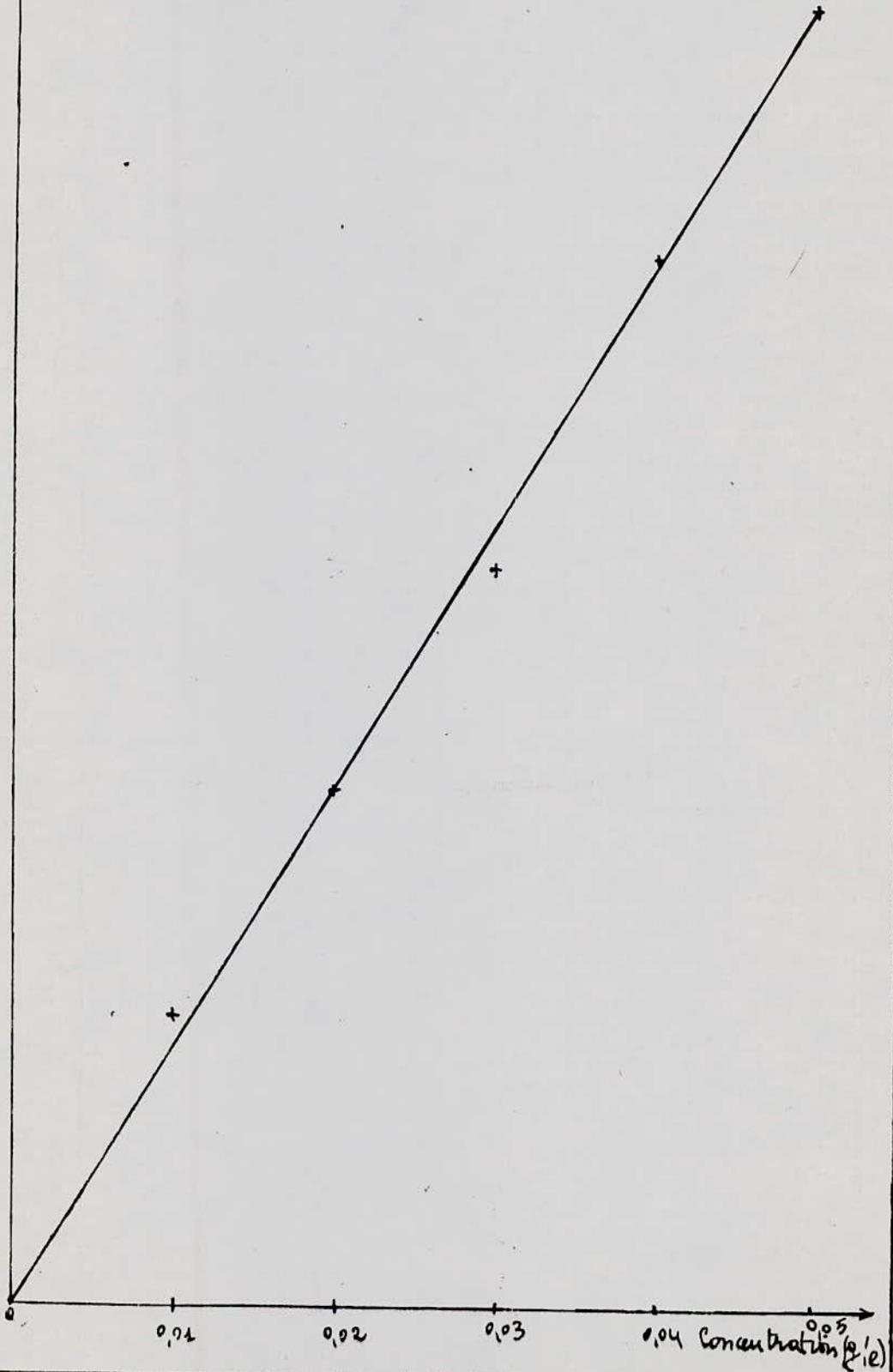
S: Concentration en substrat S: g/l

X<sub>0</sub>: Biomasse à t=0

S<sub>0</sub>: Concentration en substrat S à t = 0

↑ DO (nm)

fig I 2 Courbe d'étalonnage du lactose.



B-ETUDE EXPERIMENTALE

I -MATERIEL ET METHODE

II-RESULTATS ET INTERPRETATIONS

## II-OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE

L'objectif de l'étude sera d'optimiser le milieu de culture M composé des produits suivants:

-NH <sub>4</sub> CL	7,63 G/L
-KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,81 g/l
-Extraits de levures	1 g/l
-Lactose	
-Solution d'oligo-éléments	1 ml/l
-Solution de métaux	10 ml/l

L'optimisation portera en premier lieu sur la composition du milieu nutritionnel M et en deuxième lieu sur les conditions physico-chimiques de culture.

### II.1-OPTIMISATION DU MILIEU NUTRITIONNEL

#### II.1.1-VARIATION DE LA CONCENTRATION EN LACTOSE

La croissance de *Kluyveromyces fragilis* a été étudiée sur le milieu M contenant différentes concentrations en lactose . Le PH du milieu a été fixé à 3,5 et la température à 35°C.

A partir des courbes de croissance caractéristiques de cette levure .Les résultats sont indiqués dans le tableau II.1.

Tableau II.1:Paramètre de croissance de *Kluyveromyces fragilis* en fonction de la concentration en lactose

Concentration en lactose (g/l)	Temps de latence (h)	Taux de croissance (1/h)	Temps de (h) génération
10	0,50	0,558	1,792
20	0,75	0,431	2,32
30	1,25	0,294	3,401
40	5,75	0,144	6,822

#### Interprétation des résultats

Les résultats du tableau II.1 nous permettant de conclure que :

-La durée de la phase de latence ,évaluée d'après les courbes de croissance (fig II.1)varie en fonction de la concentration en lactose.

Nous remarquons que plus la concentration est élevée ,plus le temps de latence est grand et ceci est peut être dû à une inhibition par le substrat .

-Le taux de croissance  $\mu$ , représentant le nombre de divisions que fait la cellule par unité de temps a été déterminé à partir de la fig II.2, a été maximal à la concentration de 10 g/l  $\mu_{max} = 0,558$  1/h et nous remarquons qu'il diminue quand on augmente la concentration (fig II.3)

-Le temps de generation T, étant l'inverse du temps de croissance  $\mu$ , augmente avec la concentration, la valeur la plus élevée a été observée à 40 g/l,  $T=6,802$  h.

Donc on peut dire plus la concentration est élevée plus la cellule met de temps pour se diviser.

Donc d'après les valeurs du temps de latence, taux de croissance et taux de generation obtenus, nous aboutissons à la conclusion que les meilleurs résultats de croissance ont été obtenus à la concentration en substrat de 10 g/l.

### II.1.2:RENDEMENT EN BIOMASSE

Les rendements en biomasse pour la souche kluyveromyces fragilis en fonction de la concentration en substrat, sont regroupés dans le tableau II.2

Tableau II.2:Rendement en biomasse apres 7 heures de culture

Concentration initiale en lactose (g/l)	Concentration finale en lactose (g/l)	Y X/S (%)	X max (g/l)	t x max (h)
10	1,7	18,83	1,675	7,0
20	6,5	17,24	2,740	7,0
30	8,275	-	0,450	3,5
40	8,675	1,024	0,583	7,0

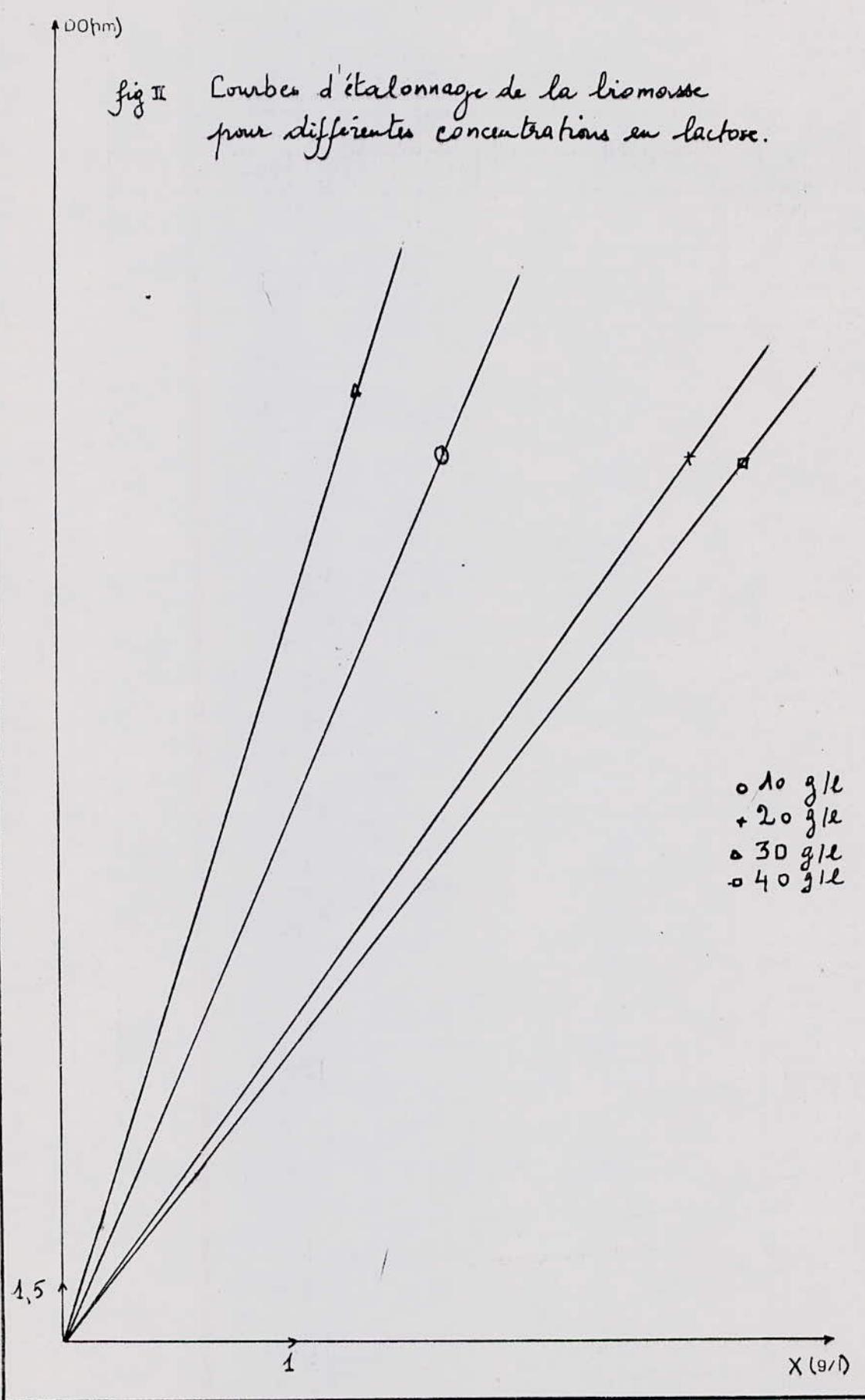
### Interprétation des résultats

D'après les résultats du tableau II.2 on peut dire que :

-Le rendement massique Y x/s a été max à la concentration de 10 g/l avec une valeur de 18,83 % et assez proche du rendement massique à 20 g/l qui était de 17,24, cependant le rendement massique à 40 g/l est très faible (1,024 %) à 30 g/l. Le rendement obtenu est < 0, il y a eu lyse des cellules.

-Concentration maximale en biomasse Xmax :Elle a été max à la concentration de 20 g/l avec la valeur de 2,74 g/l après 7 heures de culture.

fig II Courbes d'étalonnage de la biomasse pour différentes concentrations en lactose.



$x(g/l)$

fig II.1 Courbe donnant la variation de la biomasse en fonction du temps pour différentes concentrations en lactose.

- 10 g/l
- + 20 g/l
- △ 30 g/l
- 40 g/l

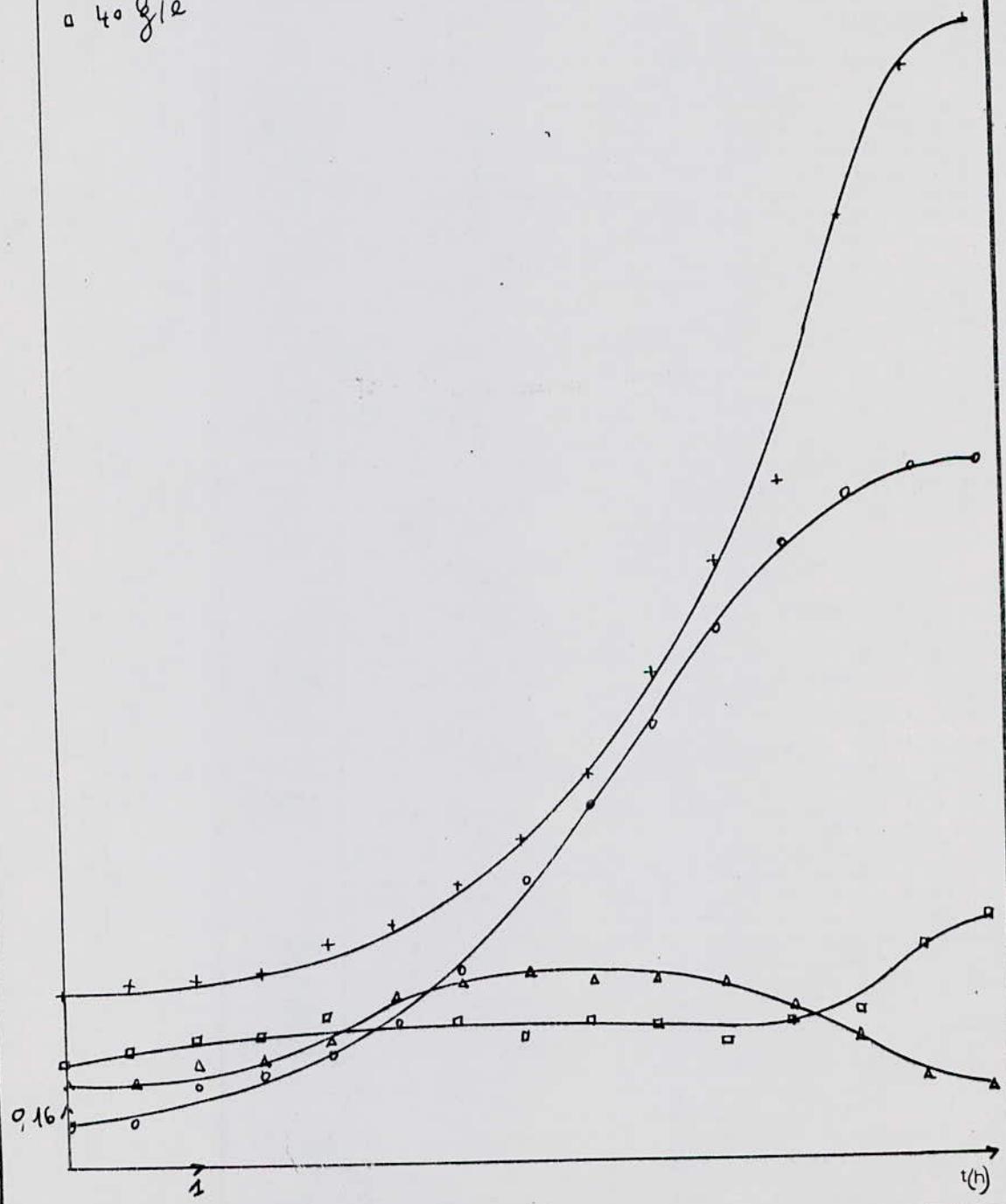
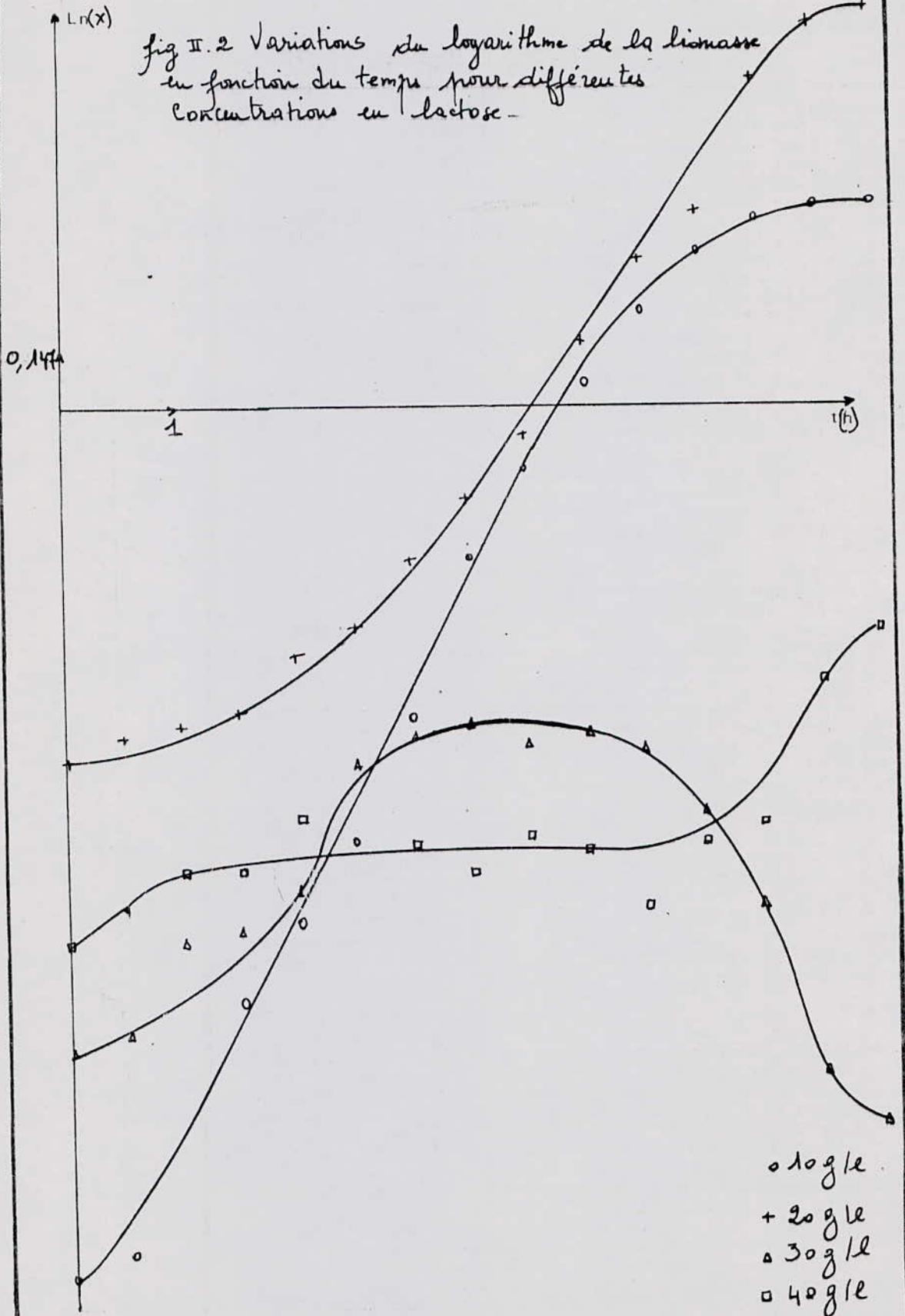
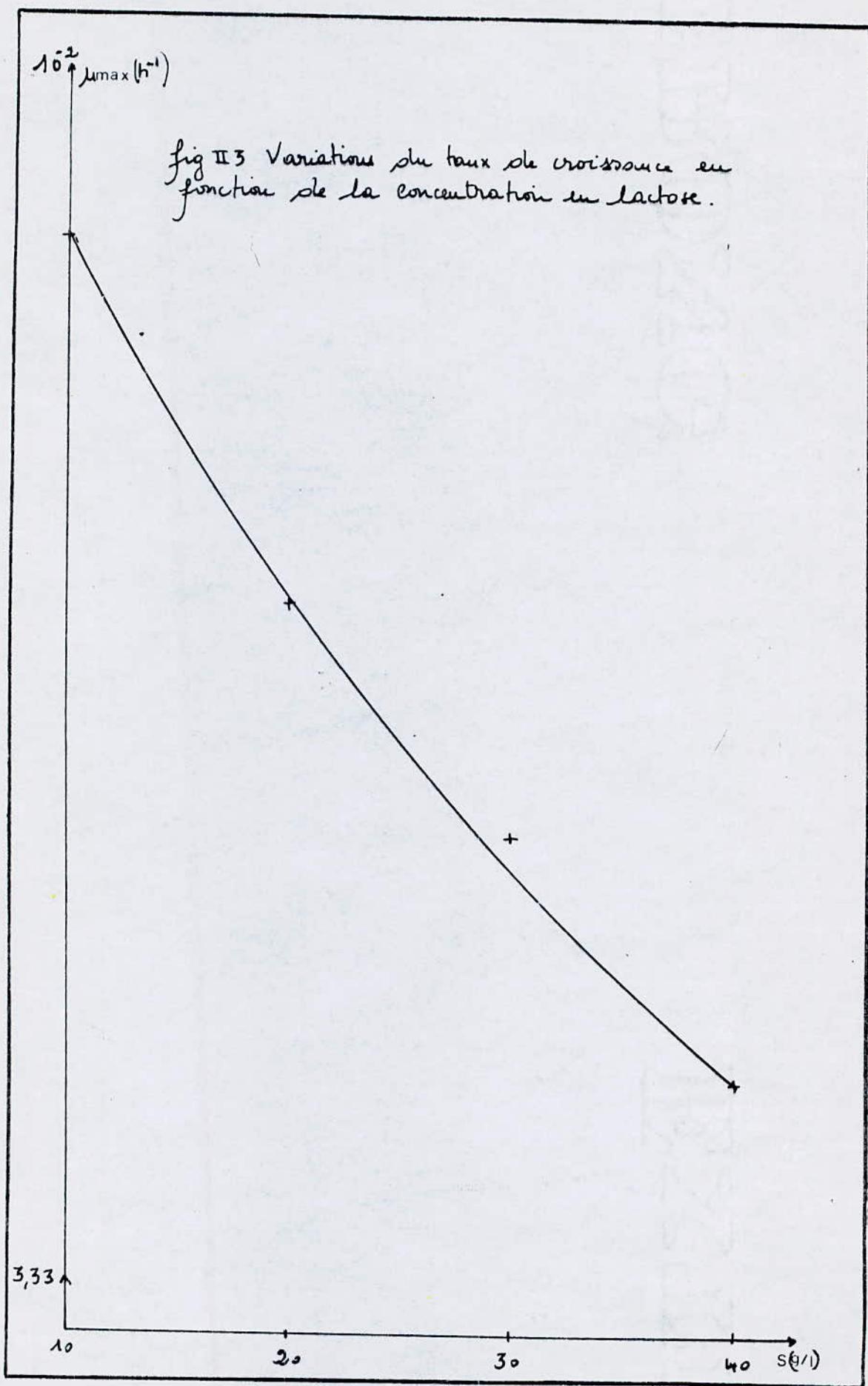


fig II.2 Variations du logarithme de la biomasse  
 en fonction du temps pour différentes  
 concentrations en lactose.





Si nous nous basons sur les résultats du rendement massique la concentration qui fournit les meilleurs résultats est 20 g/l avec  $Y_{x/s} = 17,24 \%$  ;  $X_{max} = 2,74$  g/l

### Conclusion

d'après les résultats obtenus par les paramètres de croissance et les rendements ,on peut dire que les meilleurs performances de kluyveromyces fragilis ont été obtenus pour une concentration en substrat de 10 g/l ,néanmoins la concentration de 20 g/l présente l'avantage de pouvoir travailler en milieu plus concentré ,ce qui réduit les risques de contamination et du point de vue industriel la diminution du taux de dilution du lactosérum ,amoidrit les volumes à traiter ,d'où un prix de revient de la levure plus bas.

## II.1.2-CULTURE EN PRESENCE DE 0,03 % D'URÉE

### II.1.2.1:CINETIQUE DE CROISSANCE

Pour étudier l'effet de l'urée sur la croissance du kluyveromyces fragilis ,nous avons ajouter au milieu de culture M de l'urée à une concentration de 0,03 %

Le PH du milieu de culture a été fixé à 3,5 ;la température à 35°C et la concentration en lactose à 20 g/l .

Les paramètres de croissance sont groupés dans le tableau II.3

Tableau II.3 Paramètres de croissance de kluyveromyces fragilis en présence de 0,03 % d'urée

milieu de culture	Temps de latence (h)	Taux de croissance (1/h)	Temps de génération (h)
Milieu M 0,03 % d'urée	0,5	0,558	1,79
milieu M	0,75	0,431	2,32

### Interprétation des résultats

le tableau II.3 permet de conclure que :

-Le temps de latence déterminé à partir de la fig II.4 égal à 0,5 h a été réduit par la présence d'urée .

-Le taux de croissance ,calculé à partir de la fig II.5 a augmenté par l'apport de l'urée et vaut  $\mu = 0,558$  1/H

-Le temps de generation inverse du taux de croissance a diminuer,c'est à dire que l'urée contribue à accélérer le rythme de la division cellulaire ,qui se fait en 1,79h au lieu de 2,32 h.

Les résultats obtenus ont montrés que l'apport d'urée a eu pour effet d'améliorer la croissance de levure.

### II.1.2.2-RENDEMENT EN BIOMASSE

L'apport d'urée a fait varier les résultats des rendements dans le sens indiqué par le tableau II.4

Tableau II.4:Rendement en biomasse en présence de 0,03% d'urée

Milieu de culture	concentration initiale en lactose (g/l)	concentration finale en lactose (g/l)	Y x/s %	X max g/l	t max h
Milieu M 0,03 % d'urée	20	8,19	18,24	2,455	7
Milieu M	20	6,5	17,24	2,740	7

### Interpretation des résultats

Les résultats du tableau II.4 nous permettent de conclure que :

- Le rendement massique Y x/s a été amélioré par l'apport d'urée et vaut 18,24 % contre un rendement de 17,24 % pour un milieu sans urée .

-La concentration maximale en biomasse X max ,n'a pas été améliorée et vaut 2,455 g/l au bout de 7 de culture.

### Conclusion

La molécule d'urée  $CO(NH_2)_2$  ,contenant le groupement  $NH_2$ ,contribue à améliorer les paramètres de croissance et les rendements ceci est du à une augmentation de la concentration en éléments azotés ,nécessaires à la croissance cellulaire.

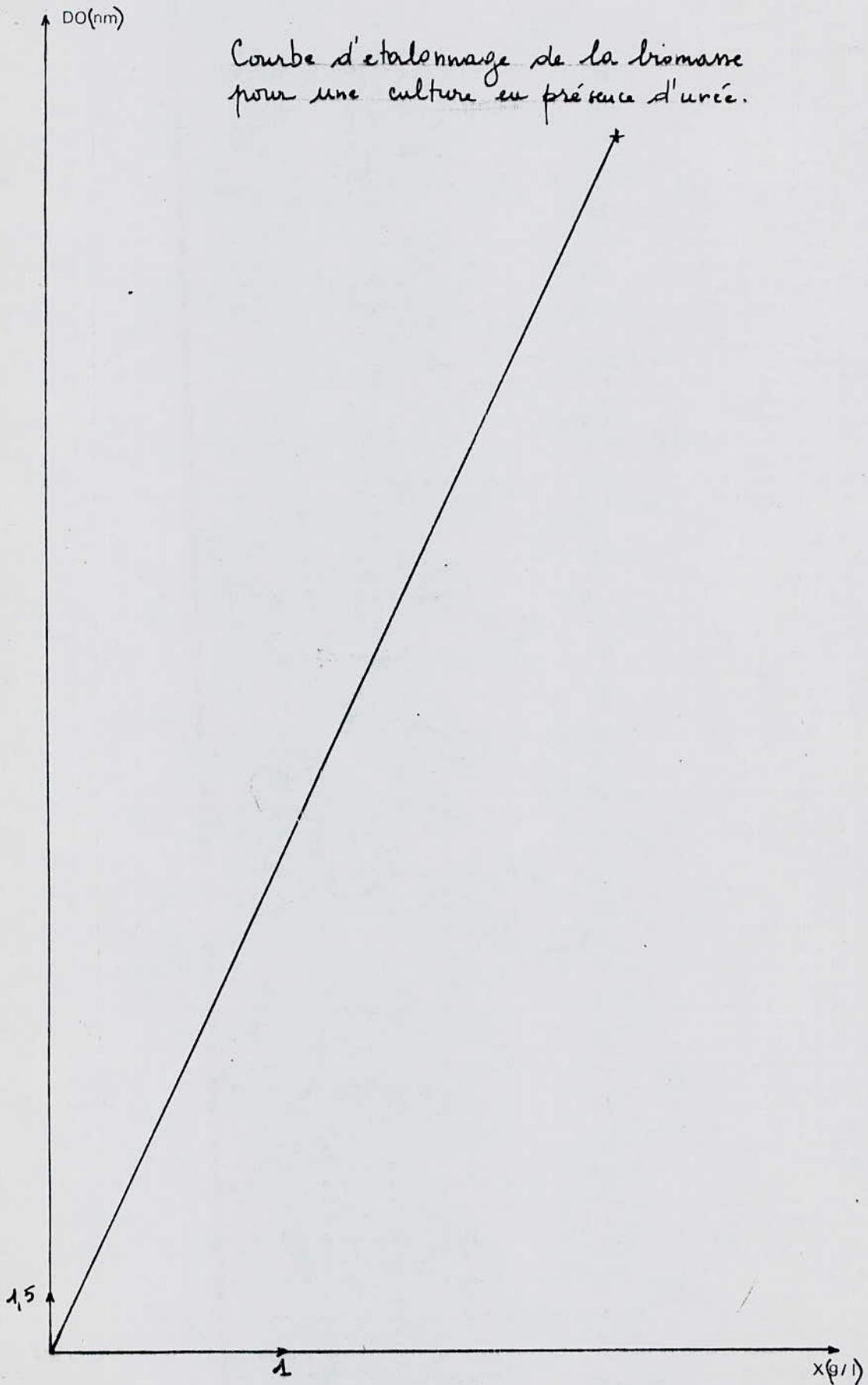
### II.1.3:CULTURE EN ABSCENCE D'OLIGO-ELEMENTS

#### II.1.3.1:CINETIQUE DE CROISSANCE

La croissance de kluyveromyces fragilis a été étudiée sur un milieu ne contenant pas les oligo-éléments .

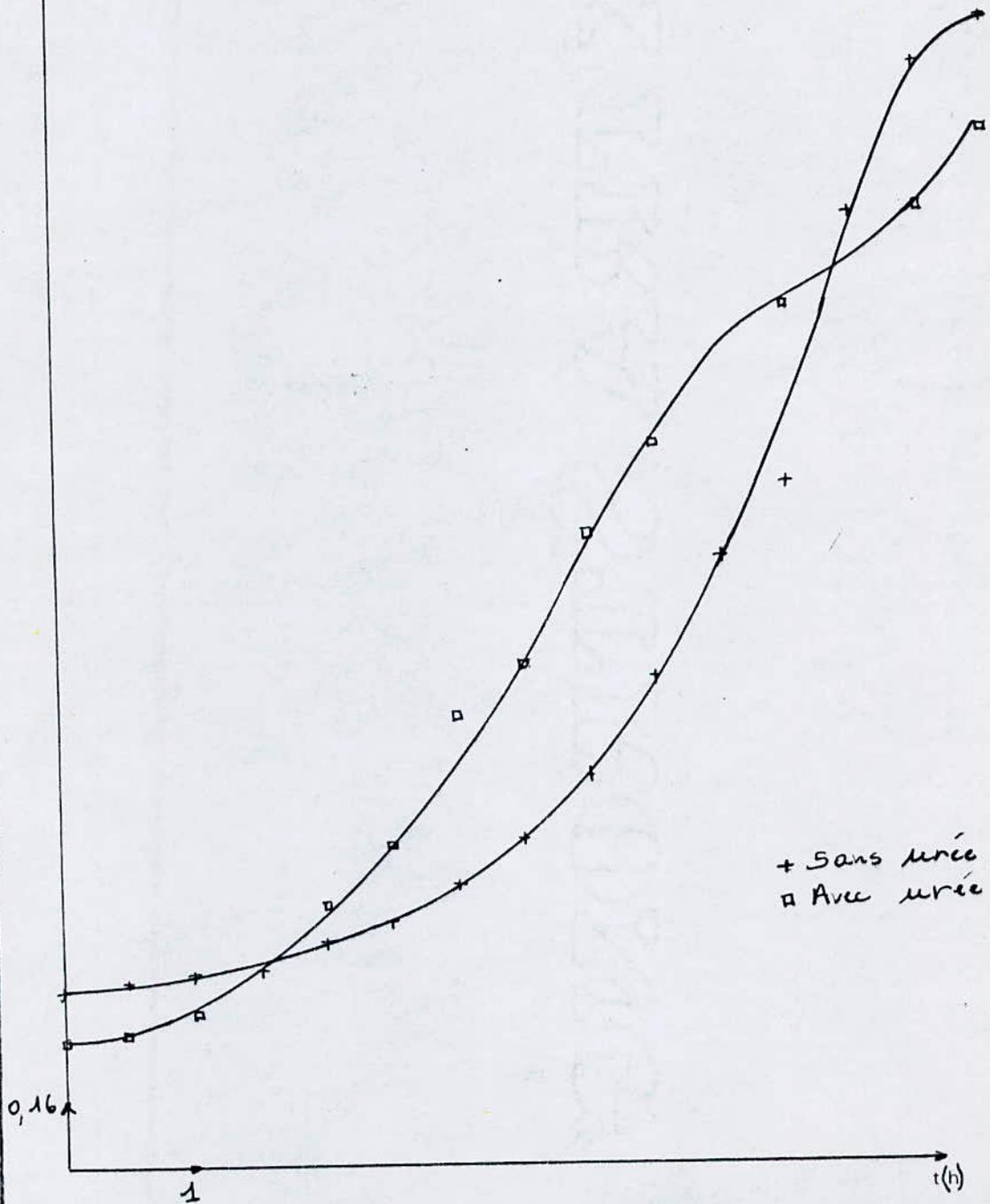
Le PH du milieu de culture a été fixé à 3,5 ,la concentration en lactose à 20 g/l et la temperature à 35 °C.

Courbe d'étalonnage de la bromane pour une culture en présence d'urée.



$x(g/l)$

fig II.4 Variation de la biomasse en fonction du temps pour l'urée.



+ Sans urée  
□ Avec urée

fig II 5 Variations du logarithme de la biomasse  
en fonction du temps pour l'urée.

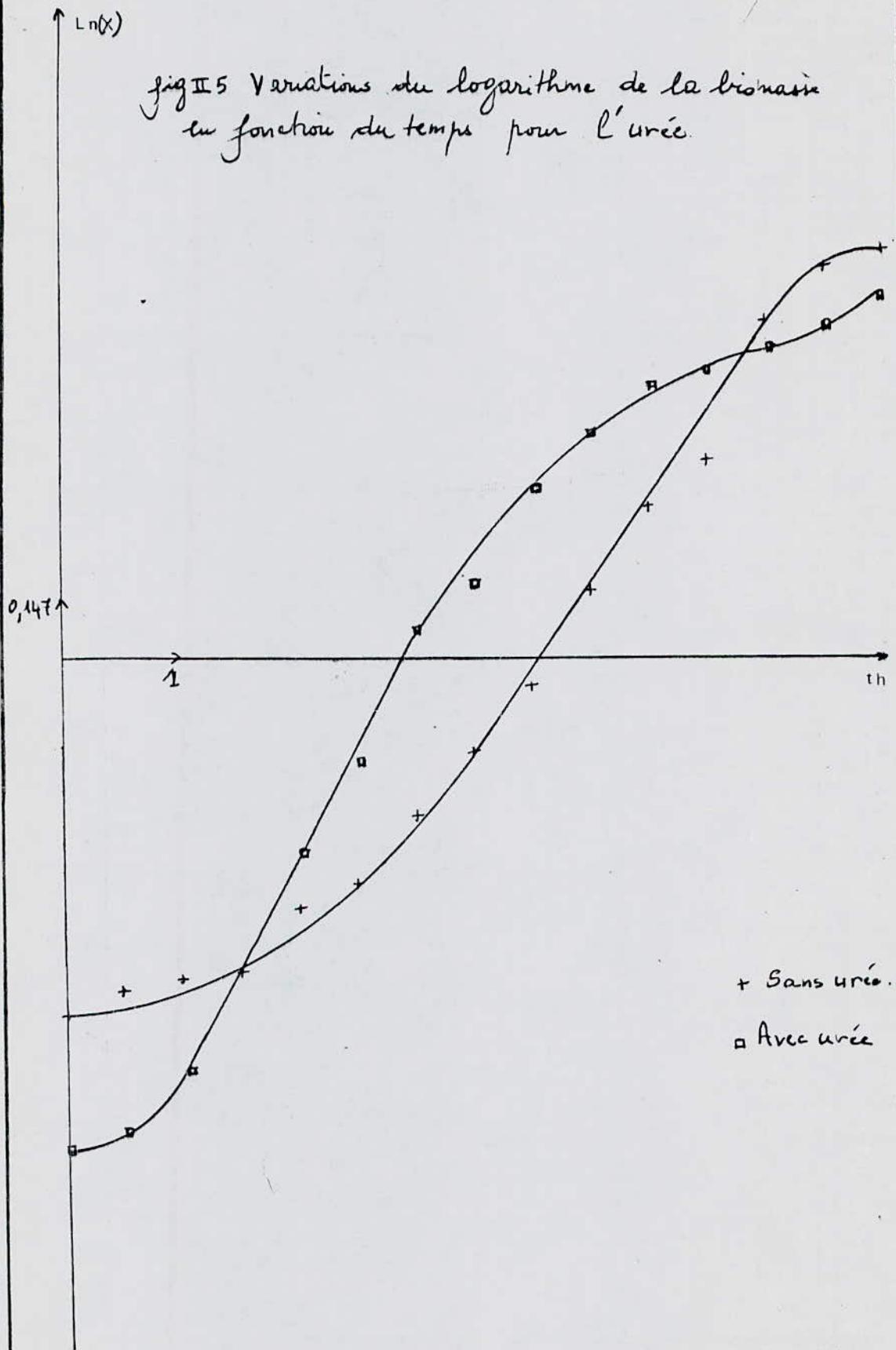


Tableau II.5: Parametres de croissance kluyveromices fragilis en absence d'oligo-éléments .

Milieu de culture	Temps de latence (h)	Taux de croissance (1/h)	Temps de generation h
Milieu sans oligo-éléments	0,5	0,426	2,34
Milieu avec oligo-éléments	0,75	0,431	2,32

### Interprétation des résultats

Les conclusions suivantes peuvent être tirées du tableau II.5:

-Le temps de latence obtenu pour le milieu sans oligo-éléments (0,5h) est inférieur à celui obtenu pour le milieu avec oligo-éléments (0,75h)

On peut donc dire que l'absence des oligo-éléments n'influe pas sur la phase de latence (voir fig II.6)

-Le taux de croissance obtenu à partir de la fig II.7 pour la culture sans oligo-éléments, et qui est égal à 0,426 1/h est légèrement inférieur à celui obtenu pour la culture avec oligo-éléments et qui vaut 0,431 1/h, cependant la différence n'est pas importante .

-Le temps de génération, qui est l'inverse du taux de croissance pour la culture sans oligo-éléments est légèrement supérieur et vaut 2,34 h, à celui obtenu pour la culture avec oligo-éléments qui vaut 2,32 h.

On peut dire que la suppression des oligo-éléments n'affecte pas beaucoup les paramètres de croissance.

### II.1.3.2: RENDEMENT EN BIOMASSE:

Les rendements en biomasse obtenus sont mentionnés dans le tableau II.6

Tableau II.6 Rendement en biomasse en absence d'oligo-éléments

Milieu de culture	concentrat. initiale en lactose (g/l) $S_0$	Concentra. finale en lactose (g/l) $S$	Y x/s %	X max (g/l)	t max (h)
Milieu sans oligo-éléments	20	3,75	4,51	1,075	5
Milieu avec oligo-éléments	20	6,50	17,24	2,74	7

### Interpretation des resultats

Le tableau II.6 nous permet d'aboutir aux conditions suivantes :

-l'absence d'oligo-éléments réduit fortement le rendement massique ,en effet il est de 4,51 % ;alors qu'en présence d'oligo-éléments ,elle est de 1,075 g/l contre 2,74 g/l en présence d'oligo-éléments .

On peut donc conclure que la suppression d'oligo-éléments réduit le rendement en biomasse .

### Conclusion

L'absence des oligo-éléments n'inhibe pas la croissance de *kluveromyces fragilis* ,mais réduit les rendements en biomasse .Ceci est du au fait que :

-L'eau utilisée contient des oligo-éléments dont les levures a besoin cependant les concentration sont inferieures à celles requises pour avoir un bon rendement .

-L'extrait des levures ajouté au milieu contient des oligo-éléments que la levure peut utiliser.

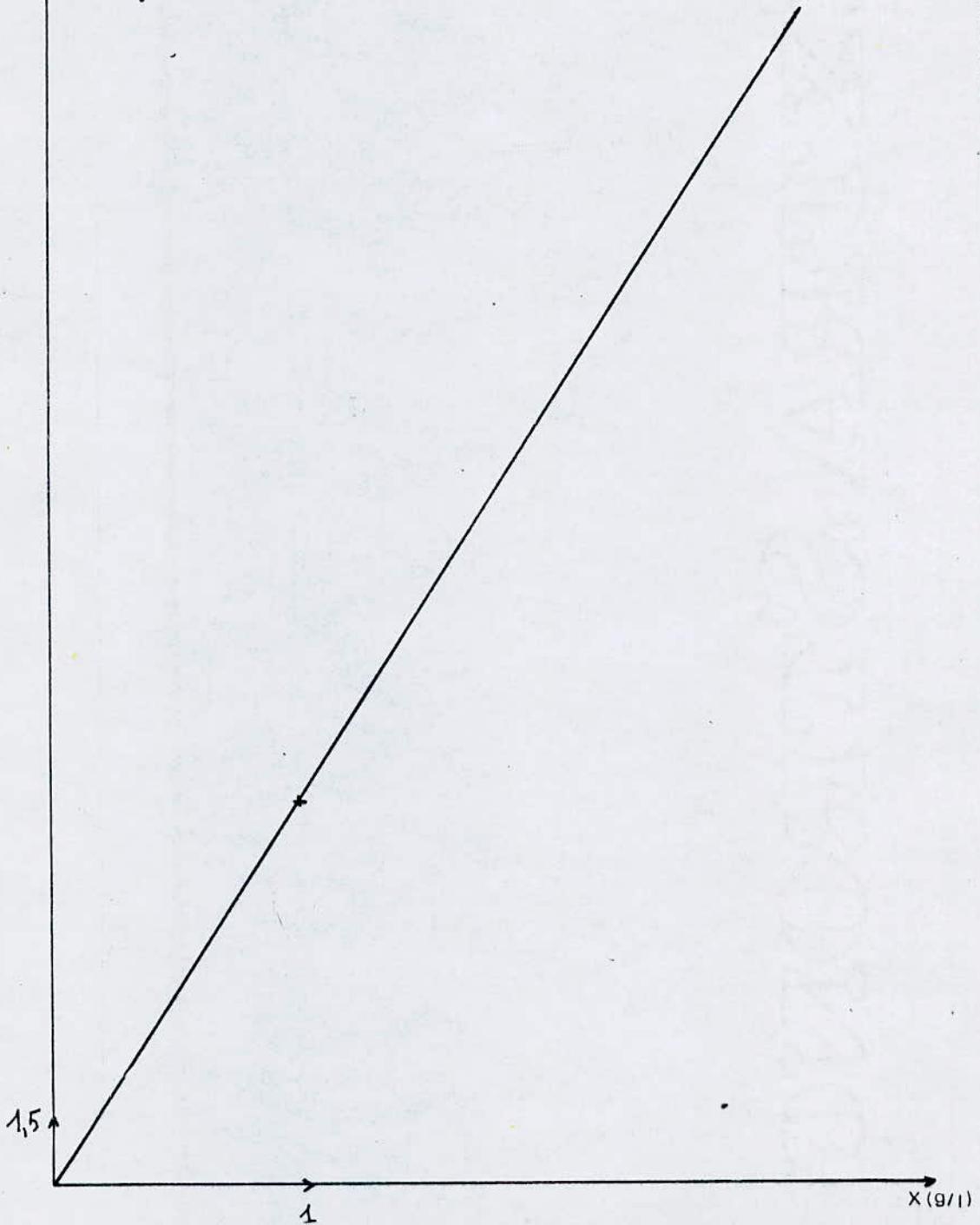
### II.1.4-CULTURE EN ABSCENCE D'EXTRAITS DE LEVURES

L'élimination des extraits de levures du milieu M de culture a eu pour effet d'inhiber la croissance de la levure *kluveromyces fragilis* .

Après 7 heures de culture on a obtenu une biomasse nulle ,la variation de la densité optique en fonction du temps a été représenté par la fig II.8

↑ DC (nm)

Courbe d'étalonnage de la biomasse pour  
un milieu sans oligo-éléments.



X(9/1)

fig II 6 Variations de la biomasse en fonction  
du temps pour les oligoéléments

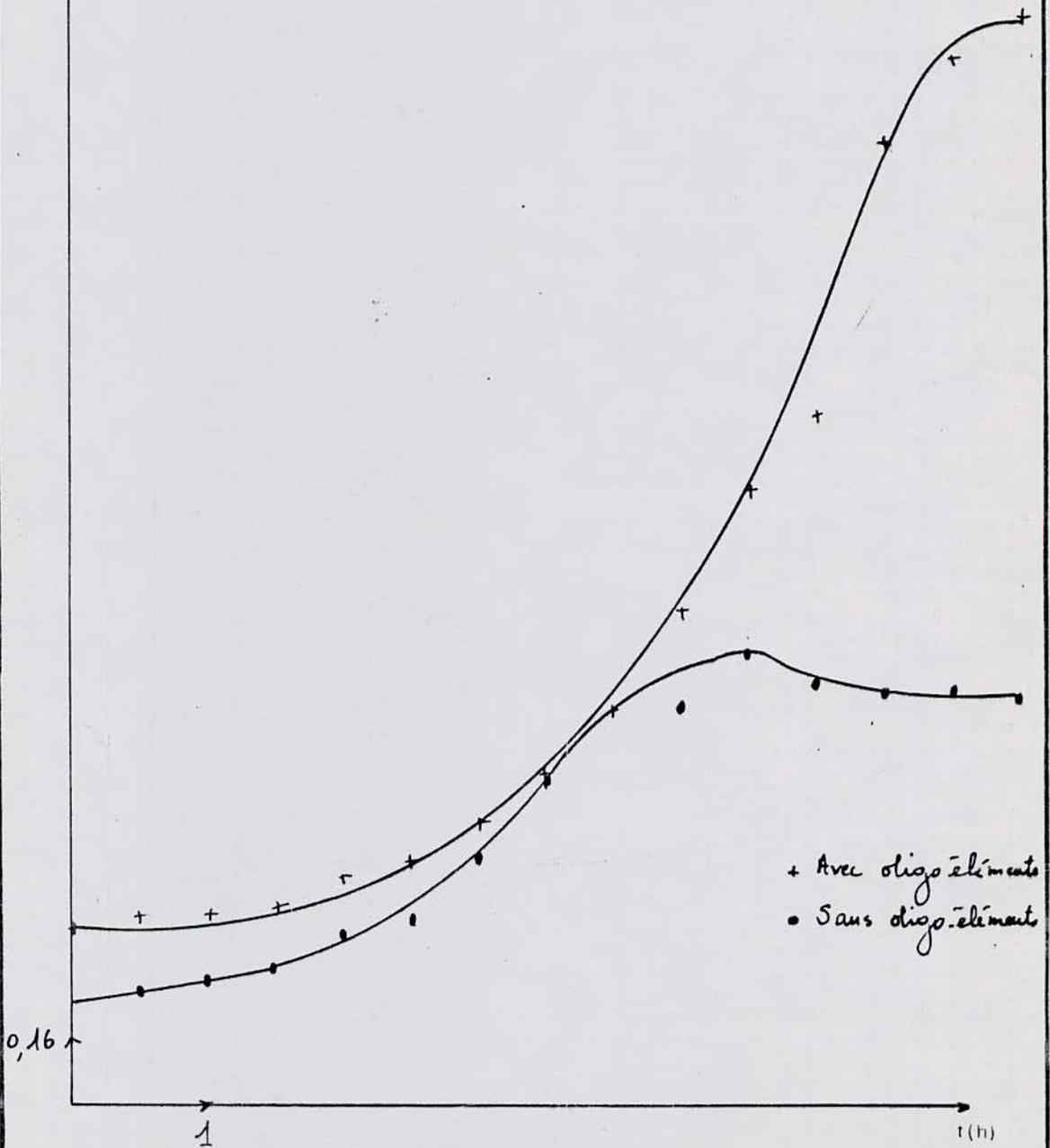
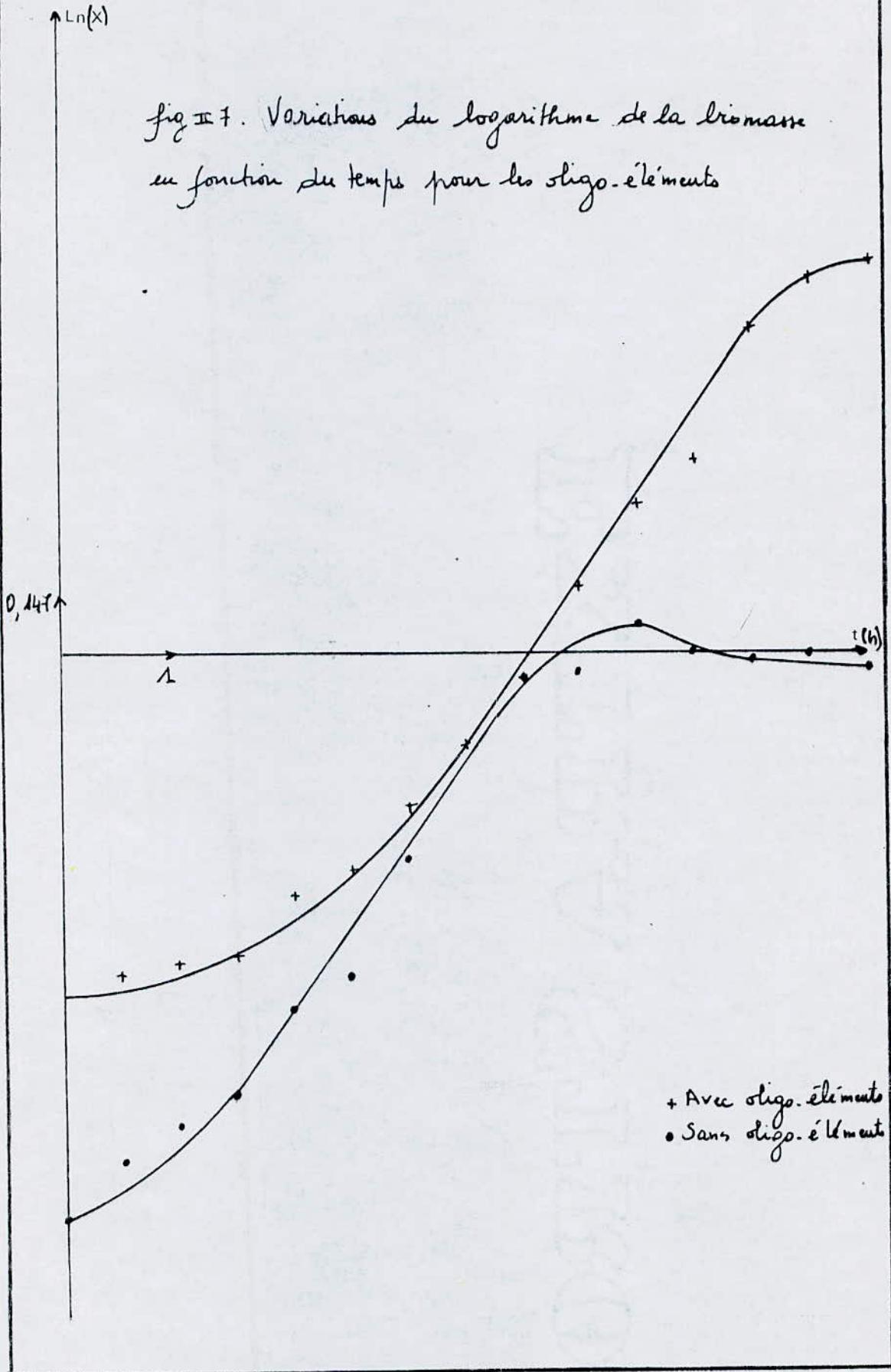
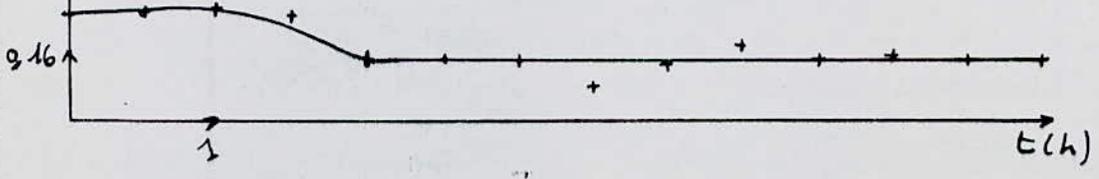


fig II 7. Variations du logarithme de la biomasse  
 en fonction du temps pour les oligo-éléments



$\uparrow D_0(\text{nm})$

fig II 8. Variations de la  $D_0$  en fonction du  
temps pour un milieu *passé* extraits de  
levures



## Conclusion

D'après le résultat obtenu nous pouvons dire que les extraits de levure contiennent des facteurs limitant; qui par leur absence, ont inhibé la croissance de *Kluyveromyces fragilis*; ce facteur est d'après Larpent 1985 est la niacine.

## II.2-OPTIMISATION DES CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES DE CULTURE

### II.2.1-VARIATION DU PH DU MILIEU DE CULTURE

#### II.2.1.1-CINETIQUE DE CROISSANCE

Le PH optimal de croissance de *Kluyveromyces fragilis* a été déterminé à partir des cultures menées à PH différents et pour lesquels on a fixé la concentration en lactose à 20 g/l et la température à 35°C.

Les paramètres de croissance déterminés à partir des courbes de croissance sont groupés dans le tableau II.7

Tableau II.7: Paramètres de croissance de *Kluyveromyces fragilis* en fonction du PH du milieu

PH	Temps de latence (h)	Taux de croissance 1/h	Temps de generation h
3,0	-	-	-
3,5	0,75	0,431	2,32
4,0	0	0,411	2,43
4,5	0,75	0,426	2,34
5	0,50	0,470	2,12

### Interpretation des resultats

Du tableau II.7 nous tirons les conclusions suivantes :

-Le temps de latence le plus faible a été obtenu à PH 4,0 (0h)  
La fig II.9 permet aussi de conclure que le temps de lactose à PH 3,5 et 4,5 sont égaux (0,75h); à PH 5 le temps de latence était de 0,5h.

-le taux de croissance  $\mu$  déterminé à partir de la fig II.10 est variable suivant le PH (fig II.10). Le taux le plus élevé a été observé à PH 5  $\mu = 0,470$  1/h, à PH 3,5; 4,0; 4,5 les taux sont assez proches.

-Le temps de generation a été maximal à PH 5 (2,12h) à PH 3,5;4,0et4,5les temps de generation sont assez proches.

En se basant sur le taux de croissance ,le temps de latence et le temps de generation ,on peut dire que le PH 5 donne les meilleurs resultats  $\mu=0,470$  1/h  $t_2=0,5$  h

### II.2.1.2-RENDEMENT EN BIOMASSE

Le calcul du rendement en biomasse pour les differents PH a donné les résultats groupés dans le tableau II.8.Ce rendement correspond à la 7ième heure de culture.

Tableau II.8 - Rendement en biomasse en fonction du PH du milieu de culture

PH	concentration initiale en lactose $S_0$ g/l	Concentration finale en lactose $S$ g/l	$Y_{x/s}$ %	$X_{max}$ g/l	$t_{xmax}$ h
3,0	20	4,55	-	-	-
3,5	20	6,500	17,24	2,74	7,0
4,0	20	0,825	16,24	3,81	6,0
4,5	20	1,950	14,62	3,24	7
5,0	20	5,075	23,33	4,05	6,5

### Interprétation des résultats

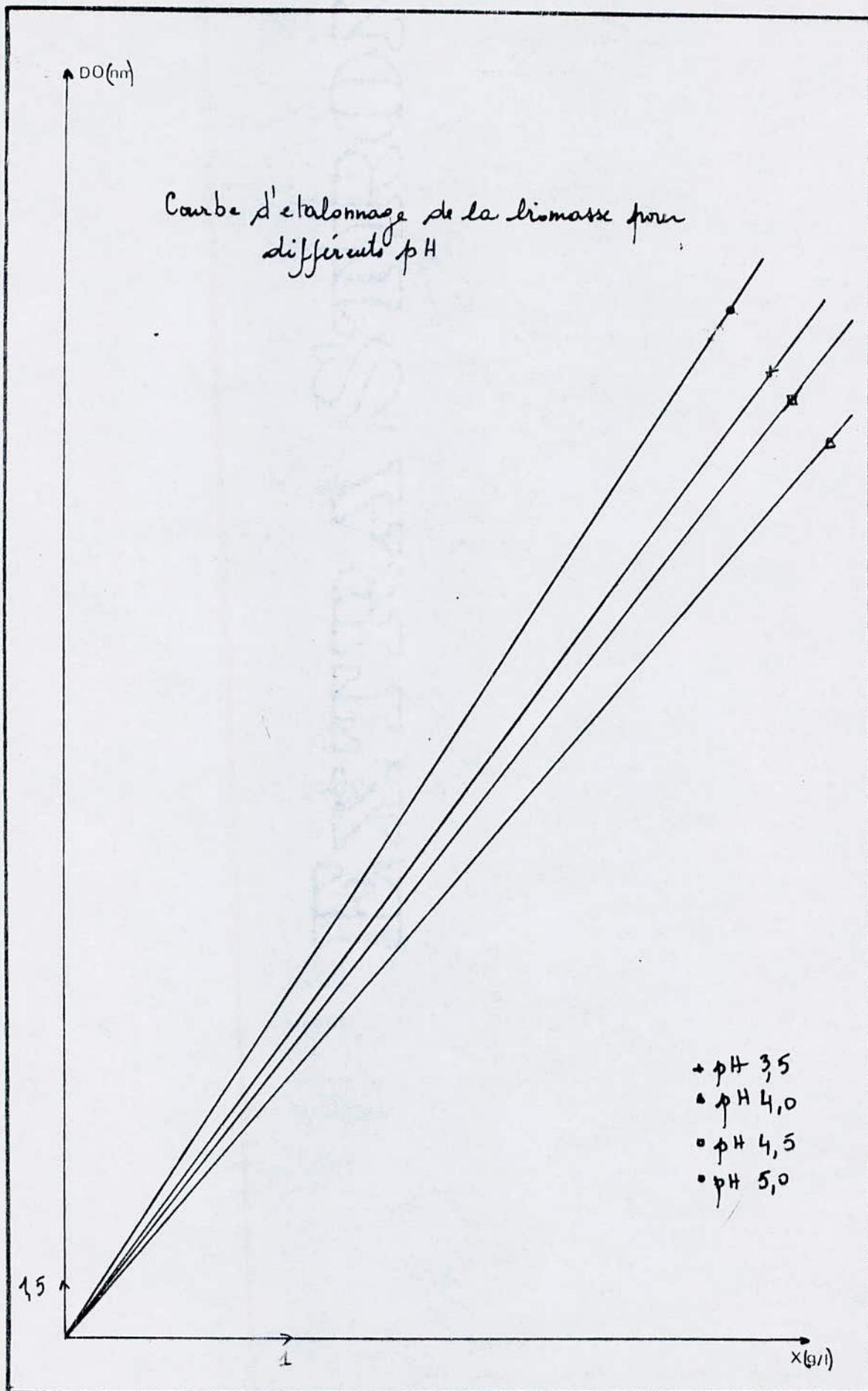
Du tableau II.8 nous tirons le conclusions suivantes: le rendement massique  $Y_{x/s}$  a été maximal à PH 5 ( $Y_{x/s}=23,33\%$ )

Les PH 3,5 et 4,0 ont donné des rendements assez voisins ,17,24% et 16,24 respectivement à PH 4,5 ,il a été logerement plus faible ( $Y_{x/s} = 14,62\%$ )

-Concentration maximale en biomasse  $X_{max}$  :La concentration en biomasse a été max à PH 5  $X_{max} = 2,74$  g/l et min à PH3, $X_{max}=0$ g/l Vu le rendement massique et la concentration en biomasse ,nous pouvons dire que le PH optimal de croissance de kluyveromyces fragilis est egal à 5, $Y_{x/s} = 23,33\%$  , $X_{max}=4,05$  g/l

### Conclusion

En se basant sur les paramètres de croissance et les rendements en biomasse ,on peut dire que le PH optimal de croissance pour cette levure est egal à 5 ,cependant il faut faire attention aux risques de contamination du milieu par des bacteries comme par exemple E.coli qui est capable de degrader le lactose et dont le PH optimal de croissance se situe entre 4,4 et 8,0.



$x(t)$

fig II 3 Variations de la biomasse en fonction du temps pour le pH

0,16

1

$t$

- + pH 3,5
- ▲ pH 4,0
- pH 4,5
- pH 5,0

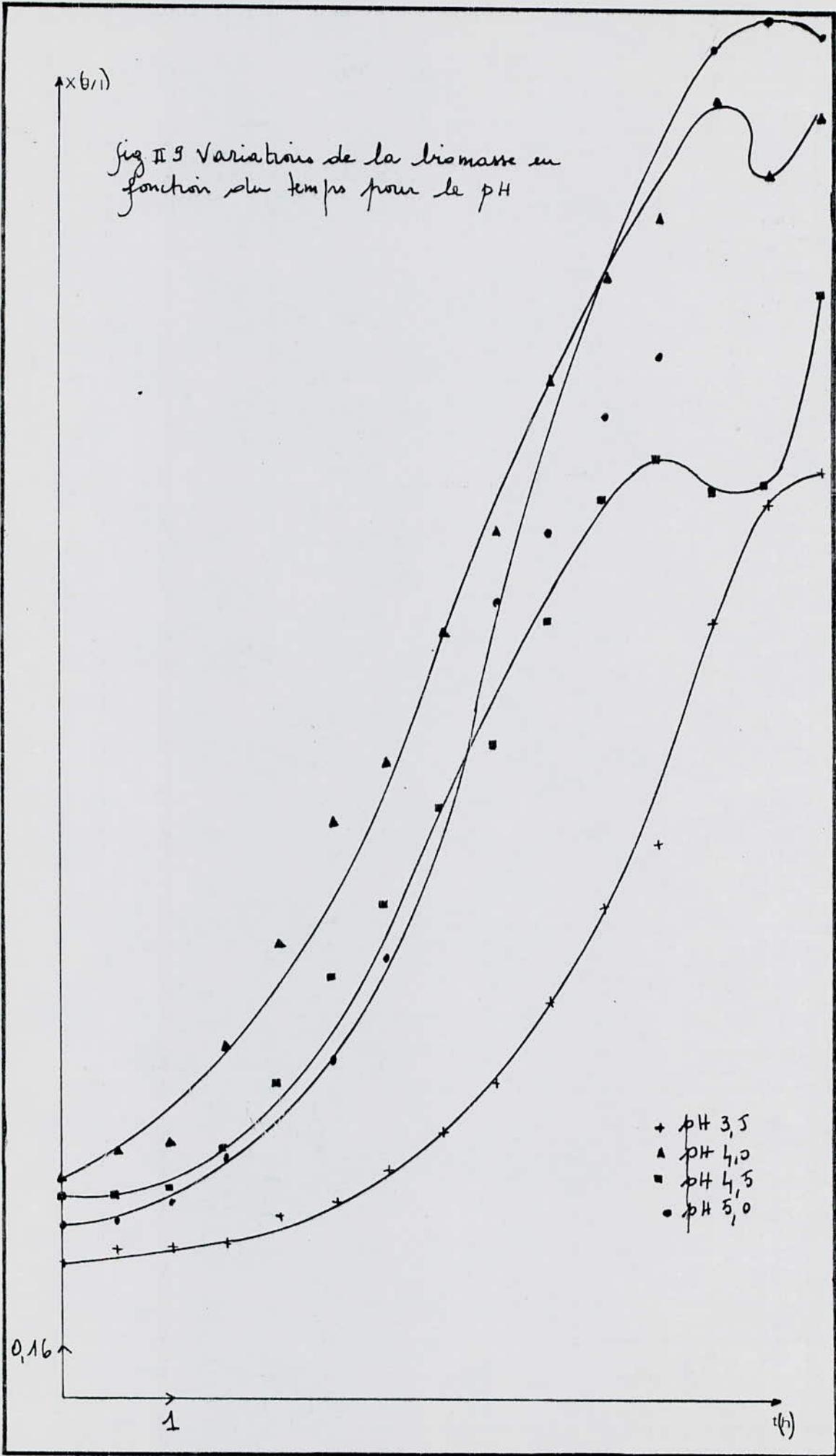
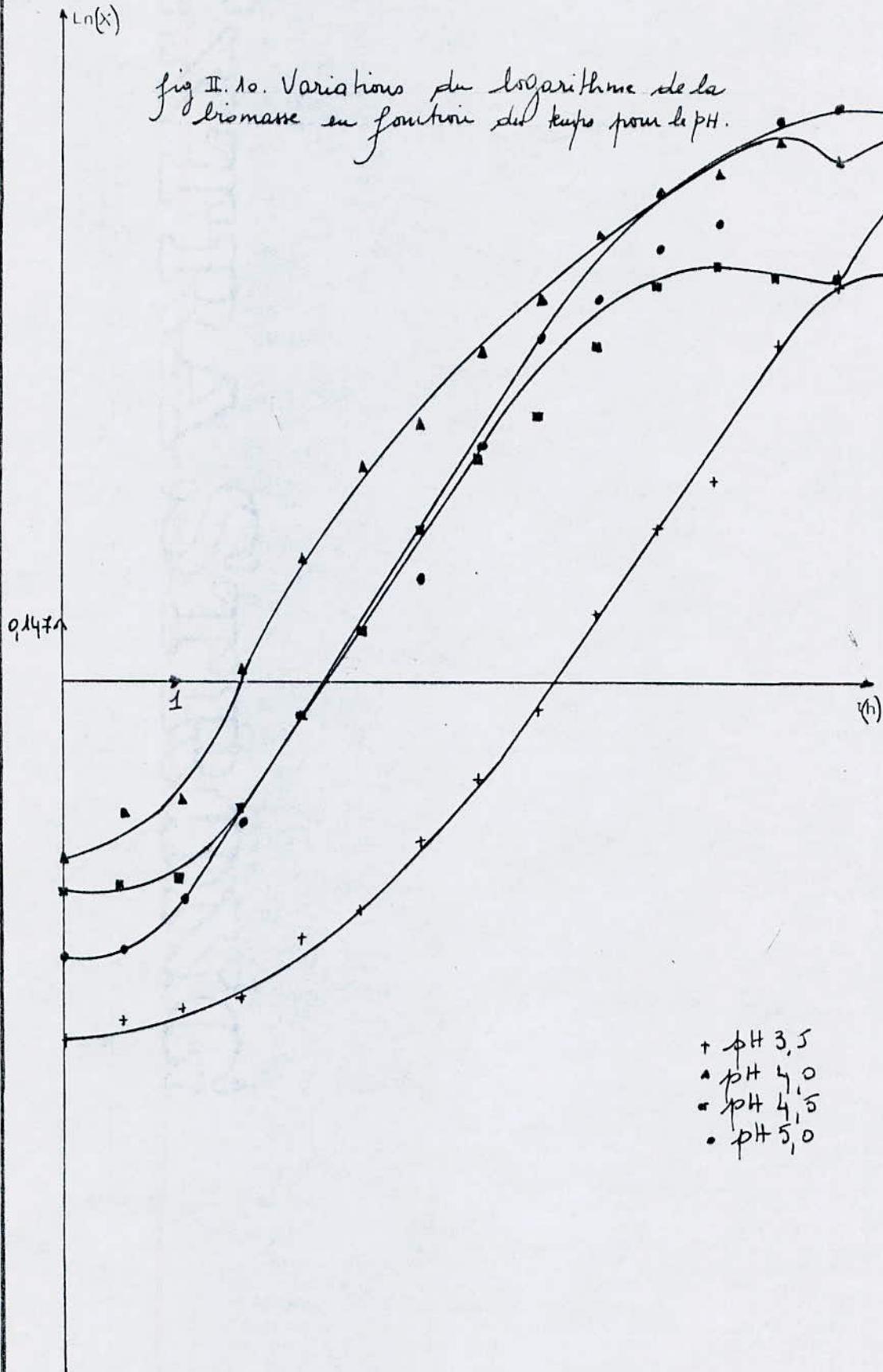
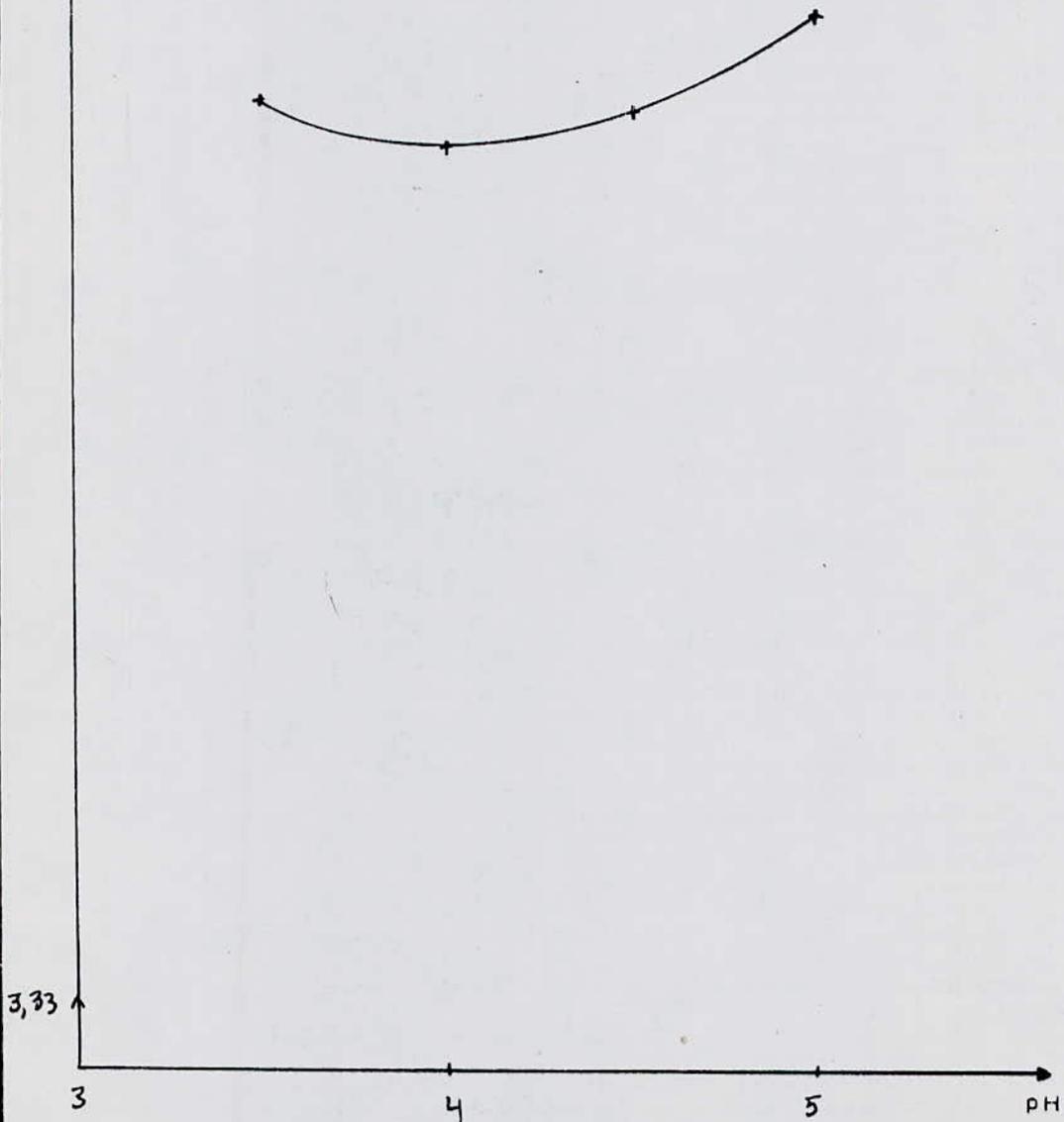


fig II. 10. Variations du logarithme de la biomasse en fonction des temps pour le pH.



$10^{-2} \mu_{max} (h^{-1})$

fig II 11. Variation du taux de croissance  
en fonction du pH.



## II.2.2-VARIATION DE LA TEMPERATURE DU MILIEU DE CULTURE

### II.2.2.1-CINETIQUE DE CROISSANCE

L'effet de la température sur la croissance de *kluveromyces fragilis* a été déterminé à partir de culture menées à température différentes.

Les paramètres PH et concentration du milieu ont été fixés respectivement à 3,5 et 20g/l.

Les paramètres de croissance sont donnés par le tableau II.9

Tableau II.9-Paramètres de croissance de *kluveromyces fragilis* en fonction de la température du milieu

Temperature °C	Temps de latence (h)	Taux de croissance 1/H	Temps de génération h
30	3,75	0,367	2,72
35	0,75	0,431	2,32
38	0,25	0,367	2,72
40	1,50	0,308	3,24

### Interpretation des resultats

Les valeurs tirées du tableau II.9 nous permettent de dire:

-Le temps de latence déterminé à partir de la fig II.12, est maximal à température 30°C (0,431 1/h). à partir de cette température, le taux de croissance décroît quand la température augmente (fig II.14)

- de taux de croissance, déterminé à partir de la fig II.13, est maximal à température 35°C,  $\mu_{max} = 0,431 h^{-1}$ , à partir de cette température, le taux de croissance décroît quand la température augmente (fig II.14)

-Le temps de génération est maximal à 40°C (3,24 h) et il augmente avec la température.

Les résultats montrent que la température optimale de croissance de *kluveromyces fragilis* est 35°C  $\mu_{max}=0,431$  1/h  $t = 0,75$  h

### II.2.2.2-RENDEMENT EN BIOMASSE

Les valeurs des rendements en biomasse sont indiqués au tableau II.10

Courbe d'étalonnage de la biomasse  
pour différentes températures.

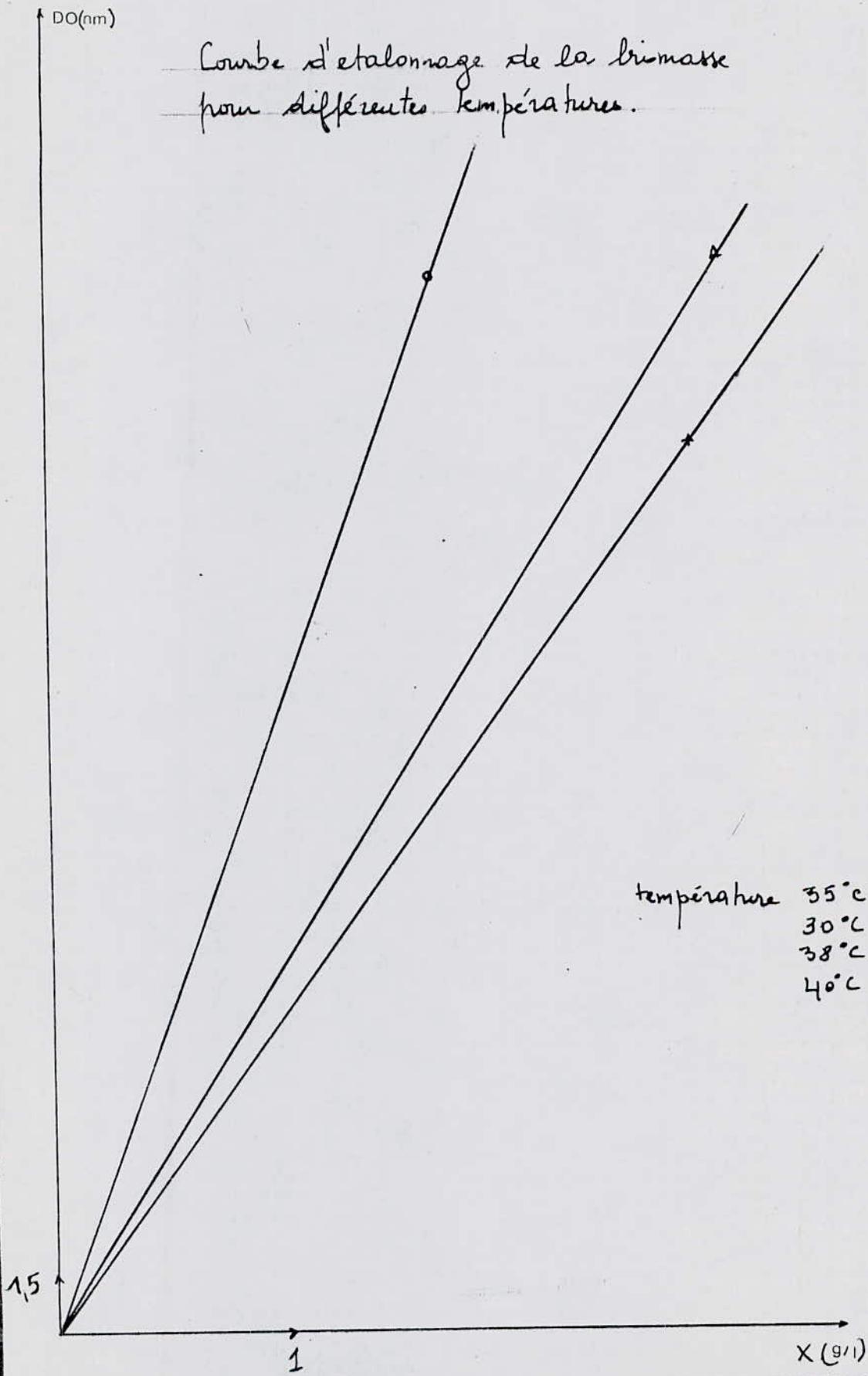
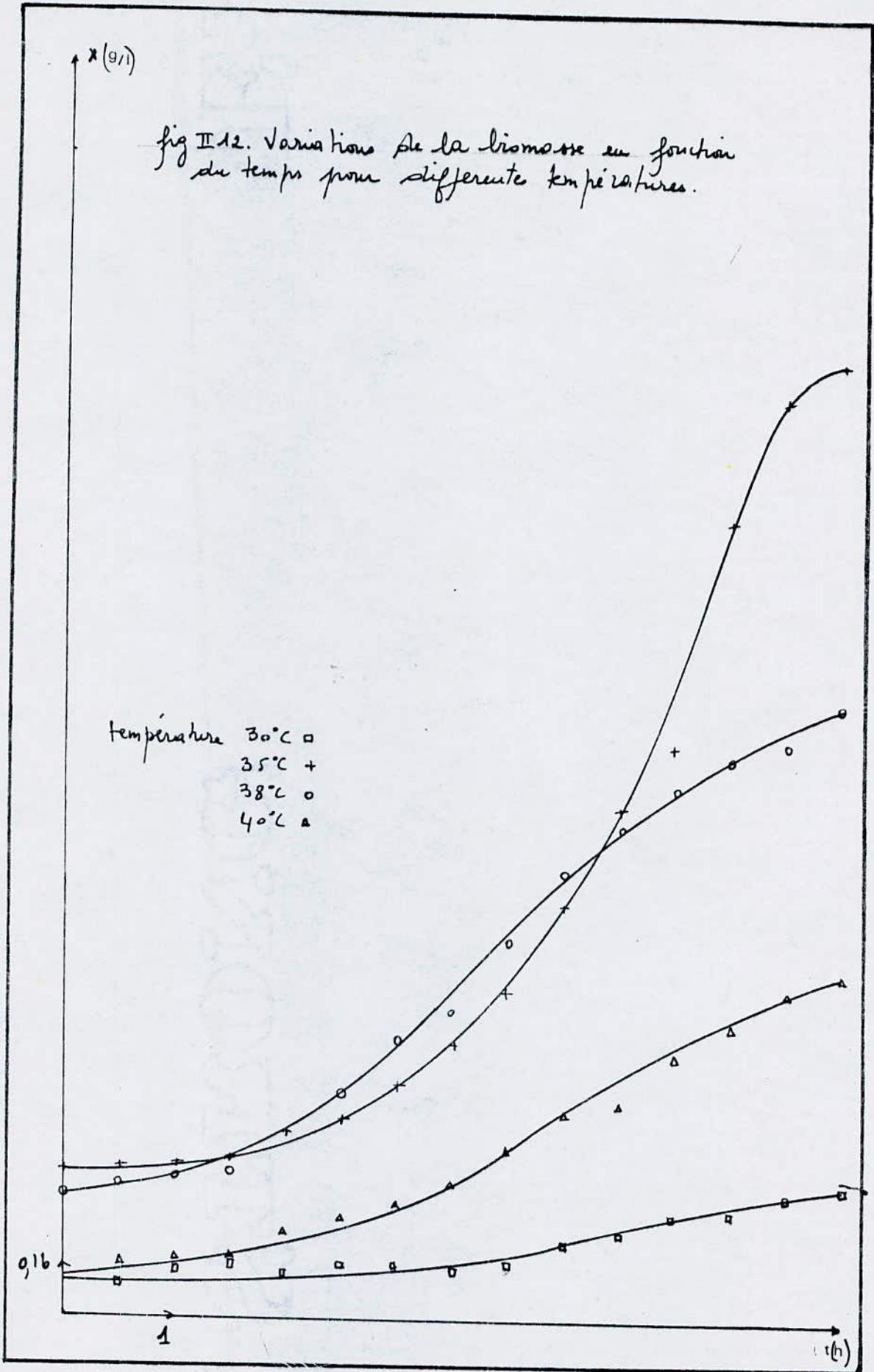
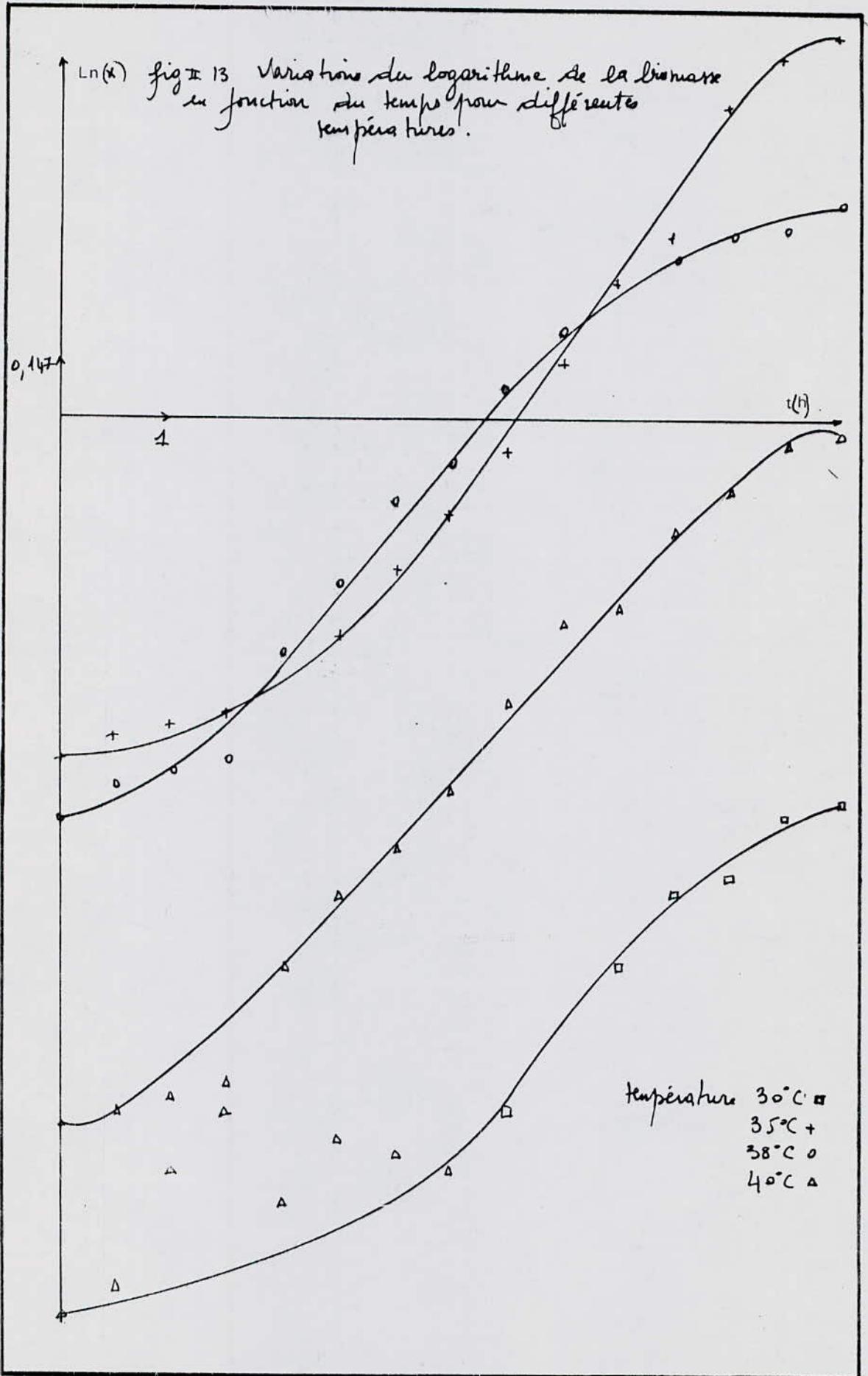


fig II 12. Variations de la biomasse en fonction du temps pour différentes températures.





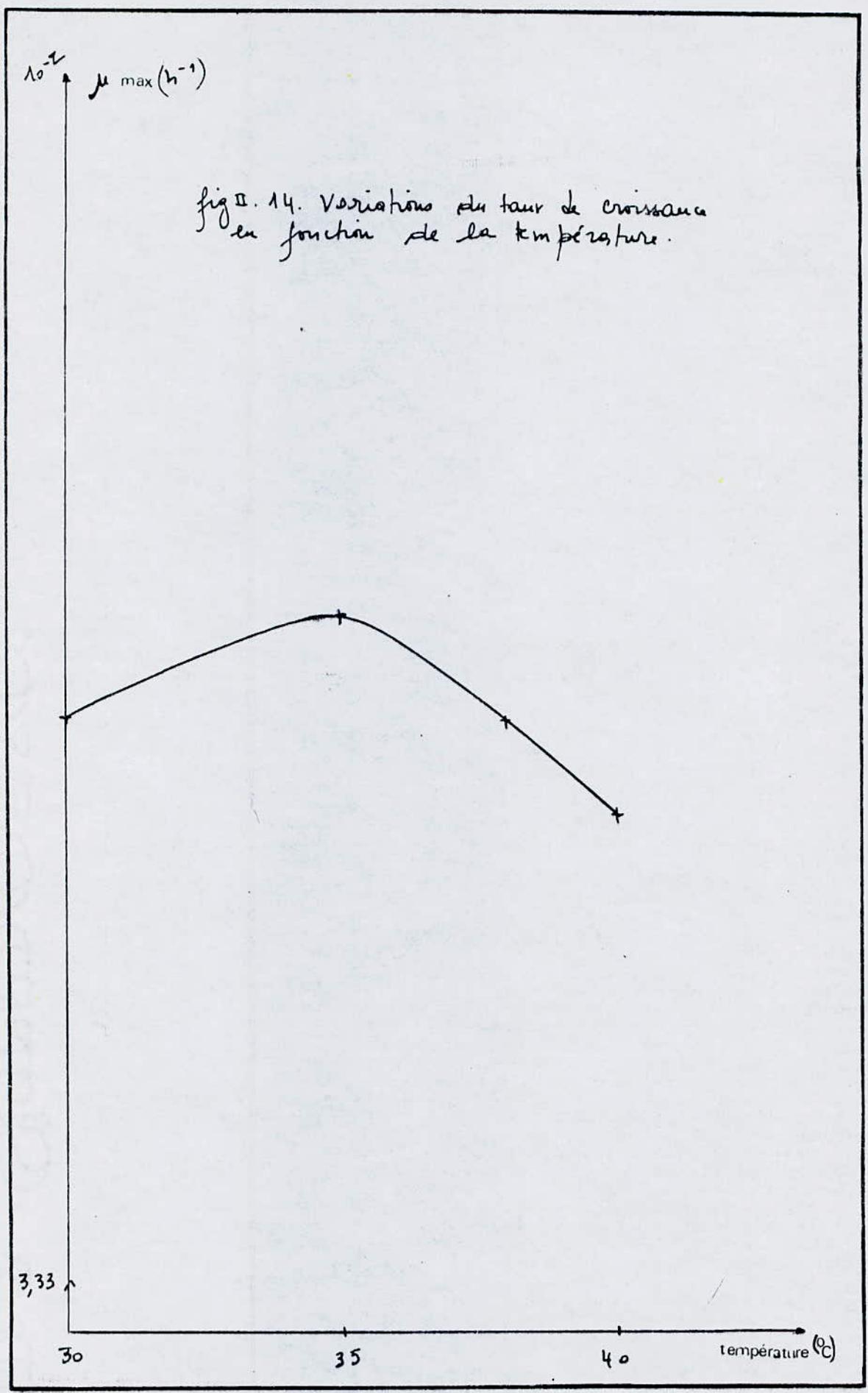


fig II. 14. Variations du taux de croissance en fonction de la température.

Tableau II.10: Rendement en biomasse en fonction de la température du milieu

Températ. °C	Concentration initiale en lactose (g/l)	Concentration finale en lactose (g/l)	Y <sub>x/s</sub> %	X <sub>max</sub> (g/l)	t <sub>xmax</sub> (h)
30	20	3,450	1,64	0,365	7
35	20	6,500	17,24	2,74	7
38	20	2,025	7,90	1,77	7
40	20	2,575	5,01	0,985	7

Interprétation des résultats :

Des valeurs tirées du tableau II.10, nous concluons que:

-Le rendement massique Y<sub>x/s</sub> a été maximal à température 35°C (Y<sub>x/s</sub>=17,24), le rendement le plus faible a été observé à température 30°C (Y<sub>x/s</sub>=1,64%)

-La concentration maximale en biomasse X<sub>max</sub> a été obtenue à température 35°C (X<sub>max</sub>=2,74g/l) et la plus faible à température 30°C (X<sub>max</sub>=0,365g/l)

En comparant les résultats obtenus pour les rendements nous pouvons conclure que la température optimale de croissance est 35°C avec Y<sub>x/s</sub>=17,24% et X<sub>max</sub>=2,74g/l

Conclusion

La température de croissance optimale de la levure *Kluyveromyces fragilis* se situe à 35°C avec un taux de croissance de 0,43 1/h à 40°C le taux décroît (U=0,308 1/h) cela est en concordance avec l'intervalle donné par la théorie au delà de la température de 40°C, la lyse cellulaire commence. Il faut aussi que l'oxygène joue un rôle dans la croissance en fonction de la température, en effet la solubilité de l'oxygène diminue quand on augmente la température donc à 40°C, l'aération du milieu a été insuffisante.

II.2.3-UTILISATION DE L'OXYGÈNE PUR

II.2.3.1-CINETIQUE DE CROISSANCE

Afin d'avoir une meilleure aération, nous avons utilisé l'oxygène pur au lieu de l'air. La concentration en lactose est de 20g/l, la température de 35°C et le PH de 3,5. Les résultats donnés par cette expérience sont groupés dans le tableau II.11.

Tableau II.11: Paramètres de croissance de *Kluyveromyces fragilis* : aération : oxygène pur

Source d'oxygène	Temps de latence (h)	Taux de croissance h	Temps de génération h
Air	0,75	0,431	2,32
Oxygène pur	0,50	0,588	1,70

### Interprétations des résultats :

Les conclusions suivantes peuvent être tirées du tableau II.11

-Le temps de latence a été réduit par l'utilisation de l'oxygène 0,50 h pour l'oxygène contre 0,75 h pour l'air (fig II.14)

-Le taux de croissance a été amélioré en utilisant l'oxygène en effet il est de 0,588 1/h ,alors qu'en utilisant de l'air on a eu 0,431 (fig II.15)

-Le temps de génération inverse du taux de croissance a été réduit en aérant avec de l'oxygène pur (1,7 h)

L'utilisation de l'oxygène pur ,améliore donc les performances de la cellule.

### II.2.3.2-RENDEMENT EN BIOMASSE

L'effet de l'oxygène sur les rendements en biomasse de kluyveromyces fragilis est donné par le tableau II.12

Tableau II.18-Rendement en biomasse:

Source d'oxygène	concentration initiale en lactose (g/l)	concentrat. finale en lactose g/l	Y <sub>x/s</sub> %	X <sub>max</sub> g/l	t <sub>xmax</sub> h
Air	20	6,5	17,24	2,74	7,0
Oxygène pur	20	0,7	17,26	3,92	5,5

### Interprétation des résultats

Du tableau II.18 nous concluons que:

-Le rendement massique Y<sub>x/s</sub> a été le même pour les deux types d'aération (environ 17%)

-La concentration maximale en biomasse X<sub>max</sub> ,a été plus élevée pour l'aération à l'oxygène pur ,en effet on obtient 3,92 g/l en aérant à l'oxygène contre 2,74 g/l en aérant à l'air.

ceci en un temps plus court (t = 5,55 h)

L'aération à l'oxygène pur donne des meilleurs résultats en des temps plus courts .

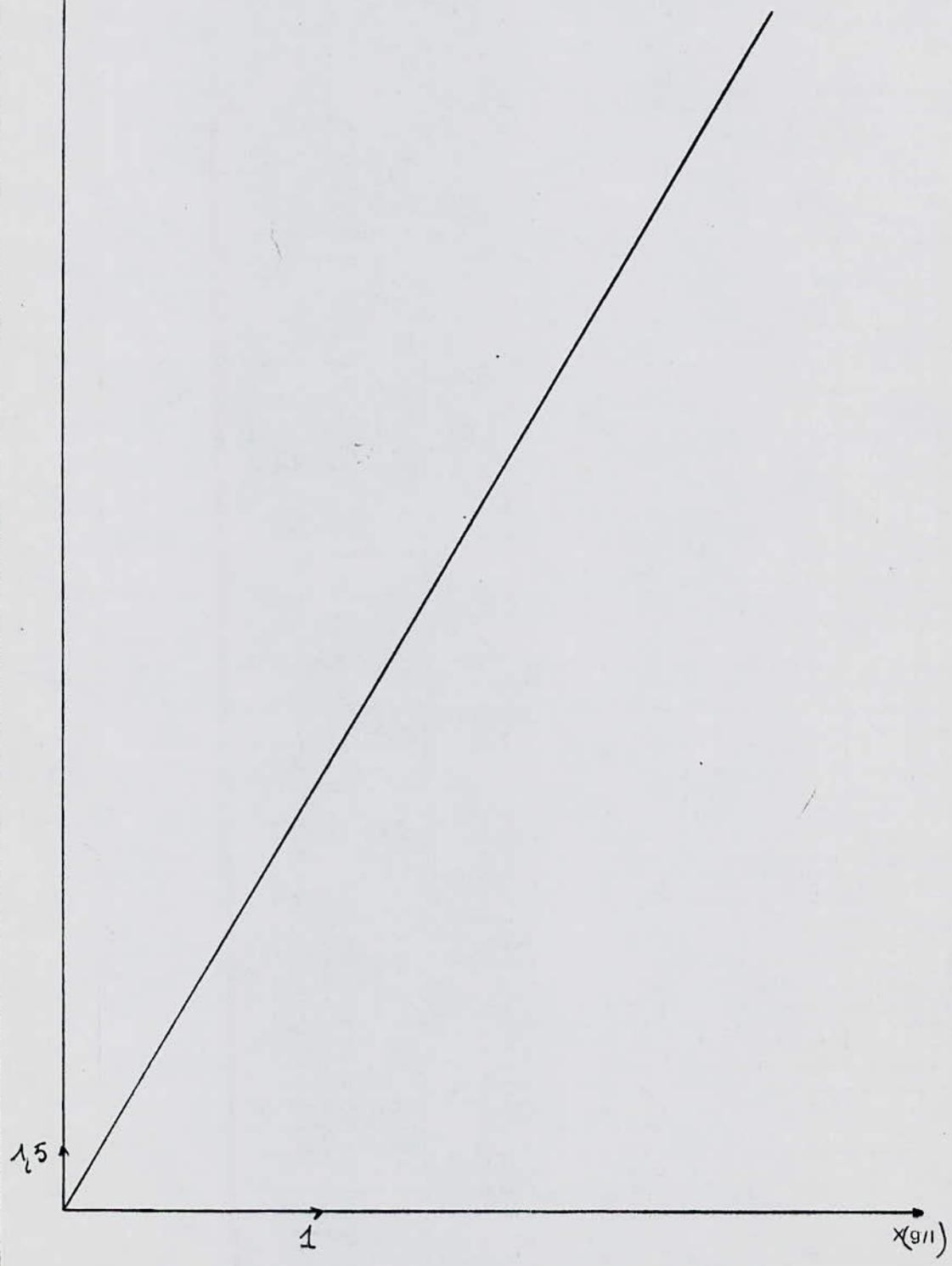
### Conclusion

Sachant que l'aération à l'oxygène pur donne de meilleurs résultats que l'air ,et sachant qu'industriellement on ne peut utiliser l'oxygène pur à cause de son prix de revient ,nous pouvons malgré cela arriver à des résultats comparables en aérant plus énergiquement le fermenteur.

L'air contenant 20% d'oxygène ,nous pouvons en utilisant un volume d'air 5 fois plus grand que celui utilisé ,arriver à obtenir des rendements plus élevés.

DO(nm)

Courbe d'étalonnage de la biomasse  
pour l'aérotwin à l'oxygène pur.



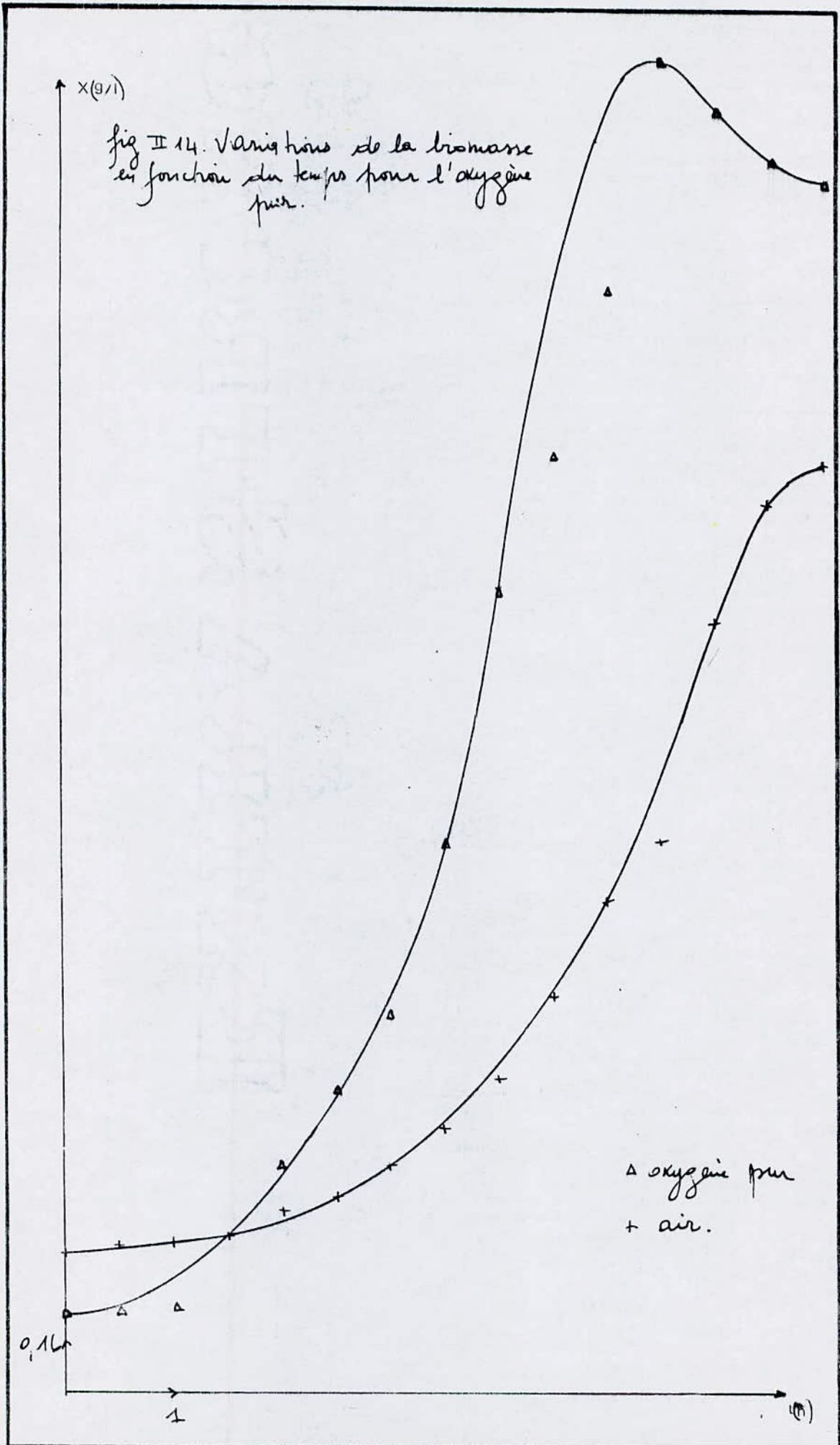
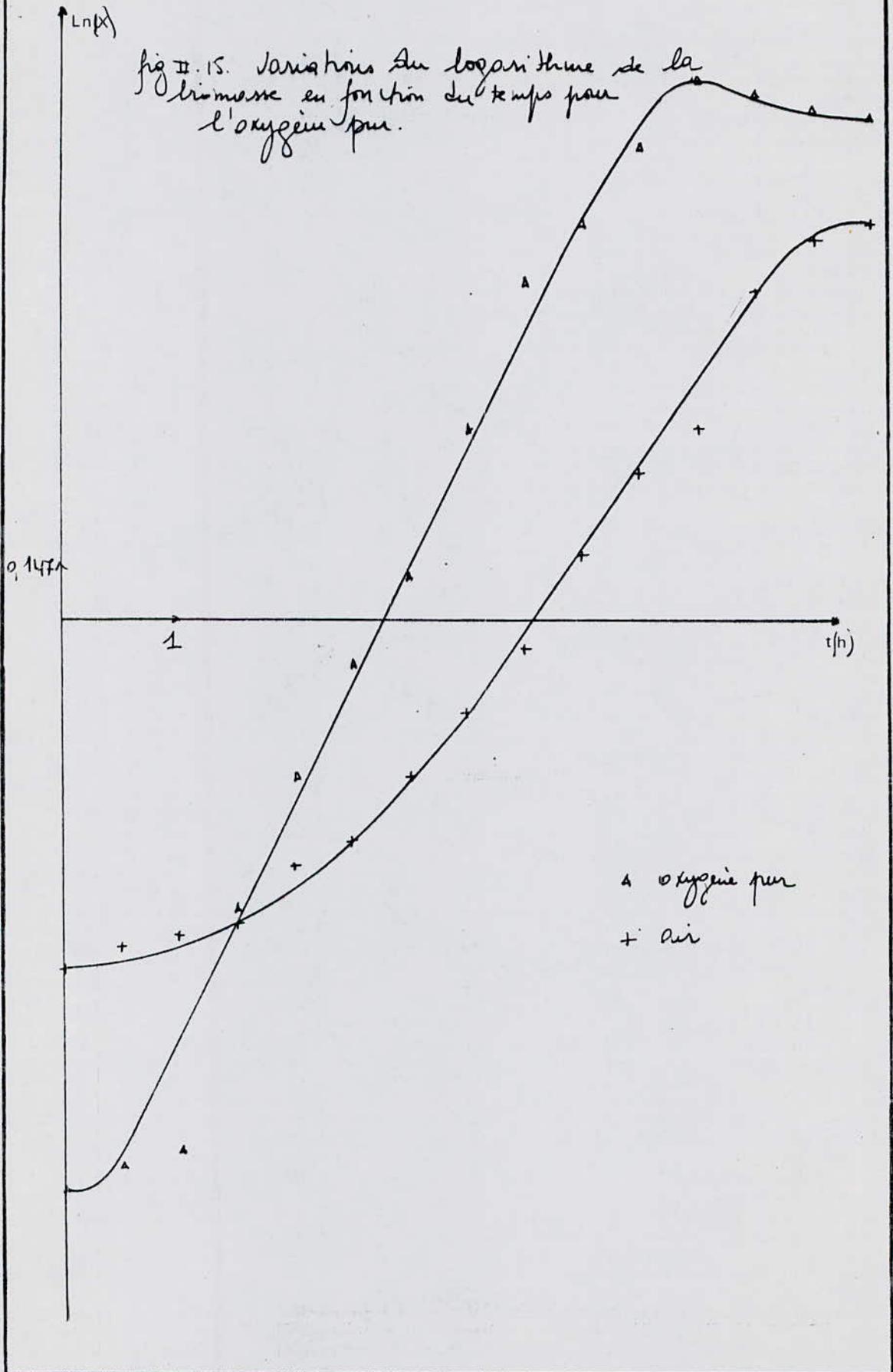


fig II. 15. Variations du logarithme de la biomasse en fonction du temps pour l'oxygène pur.



## CONCLUSION

La valorisation du lactosérum peut s'effectuer par biotransformation du lactose en levures riches en protéines, ces dernières étant destinées à l'alimentation animale. Avant de l'utiliser comme milieu de culture, le lactosérum doit subir un traitement dans le but d'améliorer les performances de la levure.

Ces traitements sont les suivants :

1- Une déprotéinisation qui permet, d'un côté de récupérer une fraction protéinique riche, utilisée en alimentation humaine et animale et de l'autre côté, la présence de ces protéines dans le milieu de culture génère beaucoup de mousses qui font déborder le fermenteur d'où l'on a risque de contamination

2- Un enrichissement du milieu en matières azotées, oligo-éléments et métaux qui permet de donner à la cellule l'alimentation dont elle a besoin pour sa croissance. Le travail que nous avons effectué a consisté à étudier l'influence sur la croissance de *Kluyveromyces fragilis* des paramètres suivants :

- Concentration en lactose initiale ( $S_0$ )
- Addition d'urée
- Suppression d'oligo-éléments
- Suppression des extraits de levures
- Effet du PH
- Effet de la température
- Aération à l'oxygène et à l'air

En comparant les résultats trouvés nous pouvons dire que les conditions de culture qui donnent une croissance et un rendement  $Y_{x/s}$  maximum sont :

- Concentration en lactose  $S = 10$  g/l
- Le PH optimum est égal à 5. Ce PH est en concordance avec celui trouvé par WASSERMAN et AL 1961
- La température optimum est égale à 35 °C, cette température est utilisée par les fromageries BEL (France)
- Une bonne aération et agitation.
- Présence obligatoire d'extraits de levures
- La présence d'urée à 0,03 % augmente le rendement  $Y_{x/s}$
- La présence d'oligo-éléments et métaux augmentent le rendement  $Y_{x/s}$

Dépendant on peut dire que les rendements trouvés sont assez faibles par rapport à ceux trouvés dans la bibliographie et ceci est dû aux raisons suivantes :

- Inoculation du milieu en phase de déclin

- La mauvaise aération du milieu ( compresseur trop faible )
- Pauvreté de l'inoculum qui s'est développé à un PH non régulé (absence d'un système de régulation du PH)
- Arrêt de la fermentation au bout de 6 à 7 heures d'expérience

Nous pouvons donc dire que la culture des levures sur lactoserum nous permet d'obtenir un produit riche en protéines avec un bon rendement si les conditions expérimentales sont satisfaites .

La récupération du lactoserum pour sa valorisation en sources de protéines pour l'alimentation a donc deux avantages

- Réduction des importations de source protéique ,d'où un impact économique considérable
- Diminution nette de la charge polluante rejetée par les laiteries , d'où un impact écologique important

## ANNEXE

- 1-Composition de la solution d'oligo-éléments
- 2-Composition de la solution de métaux
- 3-Classification de *Kluyveromyces fragilis*

1-Composition de la solution d'oligo-éléments.

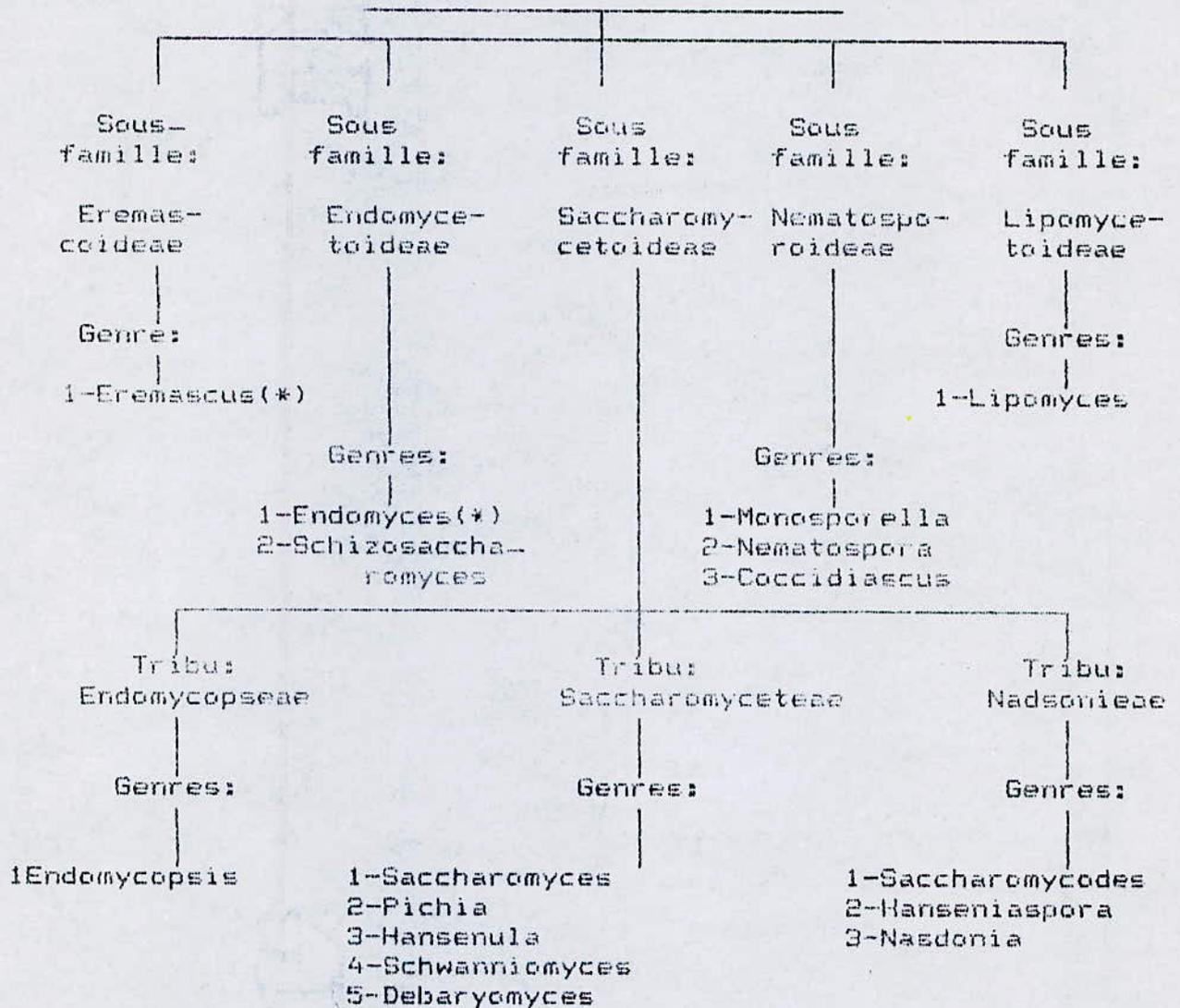
-CuSO <sub>4</sub>	5H <sub>2</sub> O	4 g/l
-CaCl <sub>2</sub>	6H <sub>2</sub> O	2,8 g/l
-MnSO <sub>4</sub>	2H <sub>2</sub> O	2,6 g/l
-H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		4,0 g/l
-KI		2,6 g/l

2-Composition de la solution de métaux

-MgSO <sub>4</sub>	7H <sub>2</sub> O	0,59g/l
-CaCl <sub>2</sub>	2H <sub>2</sub> O	0,055 g/l
-FeSO <sub>4</sub>	7H <sub>2</sub> O	0,0375 g/l
-MnSO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	0,017 g/l
-ZnSO <sub>4</sub>	7H <sub>2</sub> O	0,022 g/l

Tableau I

## Classification des levures sporogènes FAMILLE DES ENDOMYCETACEAE



## FAMILLE DES SPOROBOLOMYCETACEAE

- Genres:
- 1-Sporobolomyces
  - 2-Bullera
  - 3-Tilletiopsis(\*)
  - 4-Itersonilia(\*)

(\*)Ce genre ne renferme pas de levures au propre du mot

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. VEISSEYRE.....Technologie du lait  
Ed. La maison rustique 1979
- [2] M. LUQUET .....Les produits laitiers  
Ed. Techniques et documentation  
LAVOISIER 1985
- [3] S. TACHERIFT.....Contribution à l'étude de la  
composition biochimique de deux  
souches de levures K.LACTIS  
INA Dept. technologie projet de  
fin d'étude 1989
- [4] C. ALAIS .....Science du lait.  
Ed. SEPAIC 19
- [5] ROUCHAIS .....Le lait et ses dérivés 1948  
TAPERNOUX
- [6] P. BURY .....Méthanolisation du lactosérum.  
Rev. technicien du lait .  
Jan. fevr. 1984
- [7] M. N. ZAIDOUNE.....Etude de l'ultrafiltration du  
lactosérum sur membranes  
minérales. Université des  
sciences et de techniques du  
Languedoc. Thèse de doctorat 1983
- [8] APRIA.....Traitements et utilisations du  
lactosérum APRIA 1980
- [9] P. GOUT.....Production d'alcool carburant à  
partir du lactosérum .  
Rev. Technicien du lait  
JAN, FEV 1984
- [10] M. MARZOLF.....Production des protéines  
alimentaires à partir du  
lactosérum APRIA Octobre 1979
- [11] GIRARD .....Techniques de microbiologie  
ROUGIEUX agricole Ed. DUNOD 1967
- [12] J. Y. LEVEAU.....Physiologie cellulaire  
appliquée à la fermentation  
alcoolique par les levures  
APRIA, Janvier 1987
- [13] LARPENT.....Eléments de microbiologie .  
Ed. HERMANN 1985
- [14] LECLERC.....Microbiologie générale  
Ed. DOIN 1983
- [15] J. PELCZAR .....Eléments de microbiologie  
Ed. HRW ltée .1982
- [16] DE LAGUERVIERE.....Les levures lactiques cultivées  
sur lactosérum de protéines  
Rev. Industries agricoles et  
alimentaires Mai 1984
- [17] D. HERBERT.....Chemical analysis of J. PAIPPS  
microbiological cells

R. STRANGE

1971

- [18] ALEXEEV.....Analyse quantitative  
Ed.Mir 1980
- [19] R. SCRIBAN.....Biotechnologie Ed. Techniques et  
documentation Lavoisier 1984
- [20] M. CORDONNIER.....Fermentations  
N. COHET  
publié par le CNFC de Rennes

