

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Ecole Nationale Supérieure Polytechnique
Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Environnement

Mémoire de projet de fin d'études

Présentée par :
M^{elle} Fersadou Hayet

Pour l'obtention du
Diplôme d'Ingénieur d'Etat en Génie de l'Environnement

THEME :

**Valorisation du lactosérum
par production de l'acide lactique par
*Streptococcus thermophilus***

Soutenu le: 01/ 07 / 2009 devant le jury composé de :

Président: M^r NAMANE A. Maître de conférence, ENSP
Directrice: M^{me} HELLAL A. Professeur, ENSP
Examinatrice: M^{me} MAMECHE A. Maitre de conférence, Université de Blida
Examinatrice: M^{me} FAZOUANE F. Maitre de conférence, Université de Boumerdes

Année Universitaire: 2008 - 2009

ENSP, 10 Avenue Hacén Badi El-Harrach Alger



Dédicace

A la mémoire de mon très cher père ; à la mémoire de ma très chère mère qui m'ont offert la vie, qui m'ont toujours encouragé, mes sources d'assurance et de sagesse que dieu l'ait pitié

Je dédie ce modeste travail :

A mes gentils frères : Mounir, Abd -El -Karim et Fouad ;

A mes deux adorables sœurs : Nawel et Nora ;

A mes grands parents ;

A mes ancles et tantes ;

A mes copines : Nawel et Yamina ;

A toutes mes amies et proches ;

A tous mes professeurs ;

A tous les étudiants de ma promotion en spécialité Génie de l'environnement : 2008-2009 ;

A tous ceux qui m'ont soutenue et encouragée dans les moments les plus durs de ma vie qu'ils trouvent ici ma grande reconnaissance.





Remerciements

Louange à Dieu le tout puissant qui nous a guidés pour l'accomplissement de ce travail, et on ne saura nous faire guider sans le guide de Dieu, الحمد لله.

Je tiens tous d'abord, à exprimer ma profonde reconnaissance et ma gratitude à ma promotrice Mme A. HELAL, professeur à l'ENSP, qui ma proposé le sujet pour sa direction attentive, ses conseils avertis, son orientation, ses conseils, son aide, sa compréhension et sa disponibilité qu'elle accordait à ce travail :

M. Mameche A. et M. Fazouane F., maîtres de conférence à l'université de Blida et de Boumerdes respectivement d'avoir accepté d'examiner mon travail :

M. Mr A. N. H. M. H. N. E, maître de conférences à l'ENSP de m'avoir fait l'honneur de présider le jury :

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire pour leurs pour leur précieuse collaboration, conseils, leur soutien dans les moments les plus difficile de ma vie, précisément : Ouméssaad, Latifa, Dalila, Wafa, Asira, Saïda et Fatima :

A tous les étudiant de ma promotion en spécialité Génie de
L'environnement : 2008-2009 :

Et il y a de la place à ceux que je n'ai pas cités :

Merci

Liste des figures

<i>Figure n° I.1: Schéma général de la fabrication du fromage</i>	3
<i>Figure n° I.2 : Obtention des différents types de lactosérum</i>	4
<i>Figure n°I.3: S. thermophilus en chaînettes</i>	23
<i>Figure n°I.4 : Voies de dégradation des bactéries aérobies et anaérobies</i>	23
<i>Figure n°I.5 : phases de croissance d'une culture bactérienne discontinue</i>	25
<i>Figure n° II.1 : mode opératoire</i>	34
<i>Figure n° III.1 : Observation au microscope optique (objectif × 100)</i>	38
<i>Figure n°III.2 : Evolution du pH et de la biomasse sur lactosérum déprotéiné</i>	39
<i>Figure n°III.3: Evolution du lactose et de l'A. lactique sur lactosérum déprotéiné</i>	42
<i>Figure n° III.4: Evolution de la biomasse et du pH sur le milieu 2</i>	43
<i>Figure n° III.5: Evolution du lactose et de l'A. lactique sur le milieu 2</i>	46
<i>Figure n° III.6 : Evolution de la biomasse et du pH sur le milieu 3</i>	48
<i>Figure n° III.7: Evolution de la production de l'A. Lactique sur le milieu 3</i>	49
<i>Figure n° III.8: Evolution de la DCO au cours du temps sur le lactosérum</i>	51

Liste des tableaux

<i>Tableau n° I.1: composition du lait, fromage, lactosérum</i>	<i>5</i>
<i>Tableau n° I.2 : composition du lactosérum doux et acide</i>	<i>6</i>
<i>Tableau n° I.4 : Caractéristiques physicochimiques des différents effluents</i>	<i>9</i>
<i>Tableau n° I. 5 : Normes de rejets des différents effluents et des eaux blanches</i>	<i>10</i>
<i>Tableau n°III.1: Caractérisation du lactosérum de la laiterie d'Ouled Fayet</i>	<i>37</i>

Sommaire

Dédicace	
Remerciement	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Sommaire	
Introduction	1

Chapitre I : étude bibliographique

I.1 Le lactosérum.....	3
I.1.1 Définition	3
I.1.2 Différents types de lactosérum	4
I.1.3 Caractéristique	5
I.1.4 Composition	5
I.1.5 Valeur alimentaire et nutritionnelle du lactosérum	8
I.2 Pouvoir polluant et impact sur l'environnement	9
I.3 Valorisation du lactosérum	11
I.3.1 Utilisation à l'état liquide	11
I.3.2 Utilisation sous forme concentrée	12
I.3.3 Utilisation sous forme déshydratée	13
I.3.4 Lactosérum modifiée	14
I.3.5 Les traitements du lactosérum	16
I.4 Réglementation sur le lactosérum	17
I.5 L'acide lactique	17
I.5.1 Définition.....	17
I.5.2 Propriétés physico-chimique	18
I.5.3 Utilisations	18

I.6 Les bactéries lactiques	19
I.6.1 Définition	19
I.6.2 Caractéristiques	21
I.6.3 <i>Streptococcus thermophilus</i>	21
I.6.4 Mécanisme de dégradation du lactose en acide lactique par les bactéries lactiques – la nutrition glucidique	23
I.6.5 La nutrition azotée	24
I.6.6 Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques	24
I.6.7 Cinétique de croissance bactérienne	25
I.6.9 Paramètres de croissance	27

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1 Matériels	28
II.1.1 Matériel biologique	28
II.1.2 Milieu de culture	28
II.1.3 Produits et matériel utilisés	28
II.2 Méthodes d'analyse.....	28
II.2.1 Déprotéinisation du lactosérum	28
II.2.2 La fermentation	29
II.2.3 Mesure de la croissance bactérienne	29
II.2.4 Détermination du pH	30
II.2.5 Dosage du lactose	30
II.2.6 Dosage de l'acide lactique	31
II.2.7 Mesure de la DCO	32
II.2.8 Mode opératoire	34
II.2.9 Coloration de Gram	35

Chapitre III. Résultats et discussions

III.1 Caractérisation du lactosérum d'Ouled Fayet	37
---	----

III.2 Coloration de Gram	38
III.3 Comportement de <i>S. thermophilus</i> sur le milieu à base de lactosérum déprotéiné	38
III.3.1 Evolution de la biomasse	38
III.3.2 Evolution du pH	41
III.3.3 Dégradation du lactose et production de l'acide lactique.....	41
III.4 Influence de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne	43
III.4.1 Evolution de la biomasse	43
III.4.2 Evolution du pH au cours de la fermentation	45
III.4.3 Influence de l'extrait de levure sur la dégradation du lactose et la production de l'acide lactique	46
III.5 Influence de l'adjonction du lactose sur la culture de <i>S. thermophilus</i>	47
III.5.1 Evolution de la croissance de <i>S. thermophilus</i>	48
III.5.2 Evolution du pH	49
III.5.3 Production de l'acide lactique sur culture supplémentée de lactose	49
III.6 Analyse de la dégradation du lactose par mesure de la DCO sur les trois cultures...	50
Conclusion	53
Annexe	
Références bibliographiques	

INTRODUCTION



Introduction :

L'industrie agro-alimentaire doit faire face à un problème devenu au fil de ces dernières années de plus en plus crucial. Il s'agit de la pollution créée par les déchets et les rejets de cette industrie. L'industrie laitière en est une de l'activité agro-alimentaire.

Les fabrications fromagères utilisent une part de plus en plus importante du lait en Algérie; cette évolution est bénéfique, car elle correspond probablement à la meilleure valorisation possible du lait. Mais hélas, jusqu'à présent on n'a pas trouvé un moyen de production du fromage sans coproduire de lactosérum, ce sous produit de laiterie est actuellement rejeté dans les eaux résiduelles des usines, engendrant un problème de pollution environnementale de par sa richesse en matières organiques.

Ce petit lait est très riche en nutriments: lactose, protéines, sels minéraux, ainsi que des vitamines. Cette richesse alimentaire certaine, et le volume considérable et un pouvoir polluant important font du lactosérum un centre d'intérêt pour les chercheurs dans la voie de valorisation de ce produit.

Pour remédier à ce problème, de nombreux procédés sont utilisés pour valoriser ce produit. Parmi ces méthodes, la fermentation lactique conduisant à la production de l'acide lactique par l'utilisation des bactéries lactiques est une voie de dépollution et de valorisation du lactosérum qui a fait son apparition ces dernières années.

Contrairement au lactose dont le prix d'entrée bas et les débouchés peu nombreux, l'acide lactique de pureté raisonnable se vend à un prix intéressant et a déjà de nombreux débouchés:

- industrie pharmaceutique : acide lactique officinal;
- industrie alimentaire : agent de sapidité, agent antibactérien;
- industrie de cuir: teinture, dépressage, reverdissage;

En plus des applications potentielles telles que :

- fabrication de polymère biodégradable et biocompatible (95% acide lactique + 5% de coprolactose) ayant des applications en chirurgie (sutures biodégradables), en pharmacie (encapsulation retard) et en agriculture (libération contrôlée des pesticides);
- source d'azote non protéique et non toxique en alimentation animale (lactate d'ammonium);

Dans le but de contribuer à l'étude de la récupération de ce produit noble nous nous proposons de suivre la production de l'acide lactique produit par la fermentation par *Streptococcus thermophilus* en considérant plusieurs paramètres (cinétiques de croissance, de production d'acide lactique, de consommation du lactose, du pH et de la DCO) L'influence de certains paramètres de culture (effets de l'extrait de levure et du lactose) sur cette production seront étudiés.

CHAPITRE I

Etude bibliographique



Chapitre I : étude bibliographique

I.1 Le lactosérum :

I.1.1 Définition:

Le lactosérum est le sous produit des fromageries.

C'est un liquide opalescent de couleur vert-jaunâtre. Il est défini comme étant le résidu de la filtration du lait, coagulé par les acides minéraux ou organiques ou par la présure.

Autrement dit, c'est un lait privé de sa caséine et de son beurre [1].

Il représente environ 85 à 90 % du volume du lait employé pour faire du fromage affiné et retient environ 55% des éléments nutritifs du lait [2].

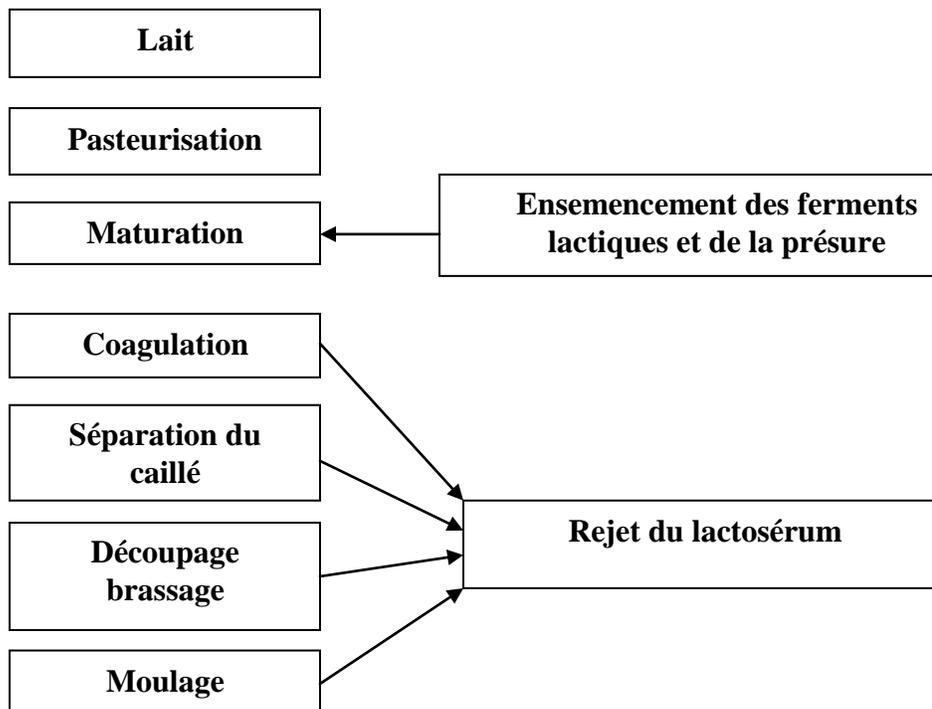


Figure n° I.1: Schéma général de la fabrication du fromage [3].

Ce diagramme représente le schéma général de la fabrication de toutes sortes de fromages (pâtes molles, pressées, fraîches).

Remarque :

Le lactosérum est séparé du caillé après la coagulation. Mais celui-ci continue de s'écouler durant les phases de découpage et de moulage et les quantités de sérum qui sont rejetées à ces différentes phases dépendent du type de fromage fabriqué.

I.1.2 Différents types de lactosérum :

La composition du sérum varie en fonction de son acidité, du type de fromage fabriqué et de la technologie employée (figure I.2). On distingue deux grandes catégories de lactosérum : [5]

- a. *Lactosérum doux*: il a une acidité inférieure à 18 °D, et un pH supérieur à 6 (6,1 à 6,7) [4], provenant de la coagulation par présure de lait non acide et conservé dans de bonnes conditions convient à toutes les transformations et utilisations. Ce lactosérum provient de la fabrication des fromages à pâtes cuites ou pressées.
- b. *Lactosérum acide* : il a une acidité supérieure à 18 °D, et un pH inférieur à 6 (4 à 6) [4], provenant de la fabrication de fromages à pâtes fraîches ou de caséines acides et une teneur en lactose réduite du fait de la fermentation lactique. La teneur en lactose dans ce type de sérum est sensiblement inférieure à celle du précédent. (voie enzymatique).

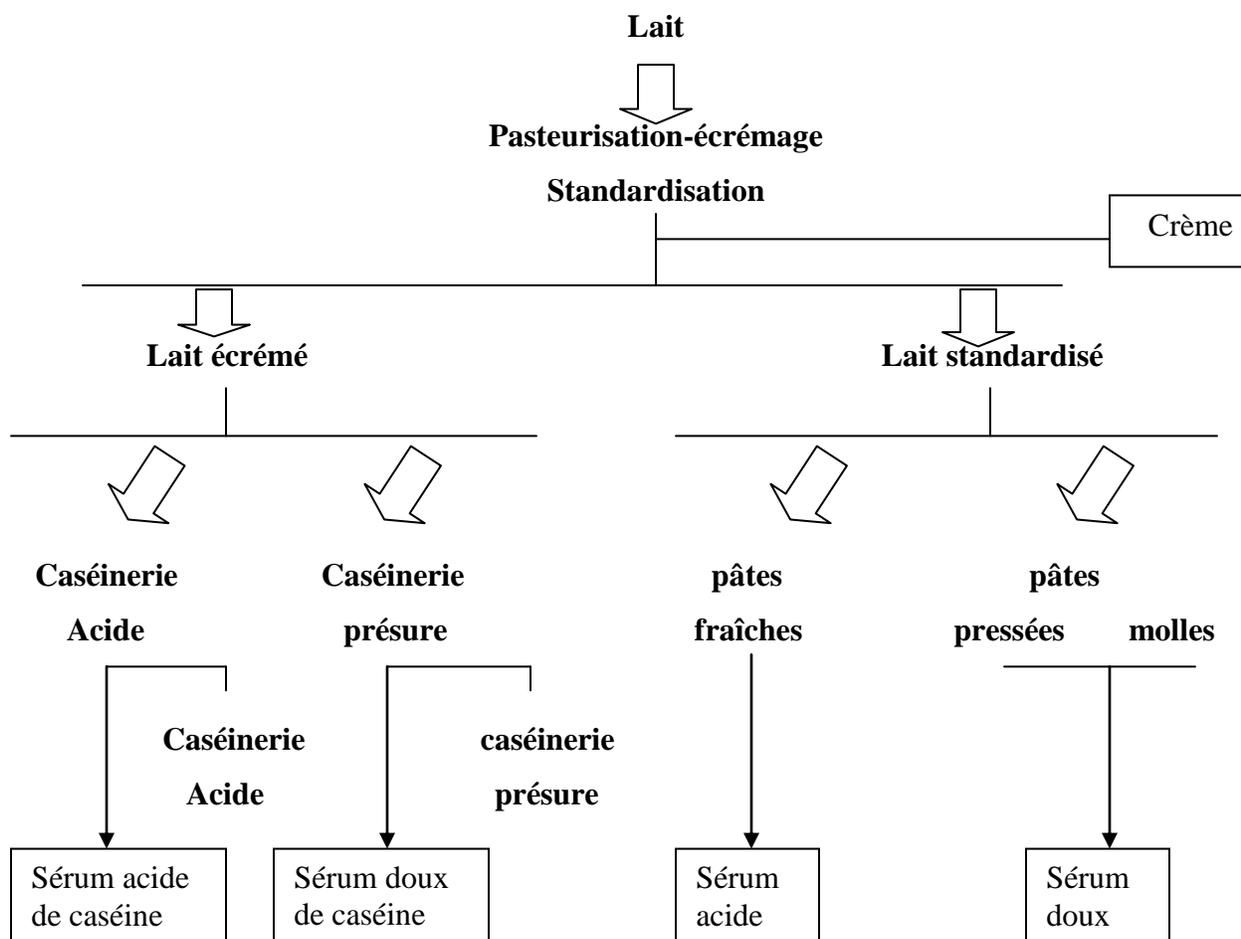


Figure n° I.2 : Obtention des différents types de lactosérum [4]

I.1.3 Caractéristique :

C'est un liquide surnageant jaune, sa couleur est dû à la présence de riboflavine (B2), son pH est compris entre 5 à 6,5, c'est un liquide riche en lactose, protéines solubles, sels minéraux et vitamines hydrosolubles [2].

I.1.4 Composition :

Le principal composant du lactosérum est l'eau, qui entre pour 93% de son volume total. Mais c'est la matière sèche (7%) qui constitue sa véritable richesse [6].

En effet, 100 g de matière sèche contiennent :

- 65 à 85 g de lactose
- 10 à 14 g de matières azotées
- 7 à 12 g de matières minérales
- 0.05 à 0.6 g de matières grasses

Selon Vrignaud, V. 1979, un litre de lactosérum liquide contient entre 60 et 70 g/l d'extrait sec; cette valeur, bien que paraissant faible, représente plus la moitié de la matière sèche du lait, comme l'indique le tableau ci-dessous :

Tableau n° I.1: composition du lait, fromage, lactosérum [4].

Constituants en g/l	lait	Fromage (pâte pressée)	lactosérum
M. grasse	38	34	4
Caséine	26	26	-
Lactose	49	-	49
Azote non protéinique + protéines solubles	8	-	8
Sels minéraux	8	8	5
Total M. sèche	129	63	66

Ce tableau indique que toute la caséine et la majeure partie de la matière grasse passe dans le fromage, tandis que la plupart des matières solubles (lactose, séroprotéines, sels minéraux) se trouvent dans le lactosérum lors de l'égouttage.

Le lactosérum a une composition variable avec le type de fabrication dont il est issu. Ainsi le sérum provenant d'une usine à pâtes fraîches sera plus acide et contiendra donc moins de lactose mais plus de sels minéraux que le sérum provenant d'une usine à pâtes molles ou à pâtes pressées (cuites ou non).

Tableau n° I.2 : composition du lactosérum doux et acide (g par 100 g de produit)

sérum	doux		acide	
pâte	cuite et pressée		fraîches et molle	
<i>M, sèche</i>	6,35	7	6,5	6,5
<i>lactose</i>	4,85	5	4,9	4,6
<i>protéines</i>	0,8	0,9	0,75	0,7
<i>M, grasse</i>	0,5	0,4	0,04	0,1
<i>condres</i>	0,5	0,6	0,8	0,7
Référence	[2]	[8]	[2]	[8]

Il existe trois différences essentielles entre les deux lactosérums. La teneur en acide lactique, la teneur en condres et le taux de matière grasse.

La première différence s'explique par le mode de coagulation, le sérum doux est issu d'une coagulation présure, tandis que le sérum acide doit son acidité à la maturation lactique du caillé. D'autre part, l'acidité du lait par les bactéries lactiques provoque la déminéralisation des micelles de caséine qui libèrent leur calcium dans le lactosérum [9].

C'est ce qui explique que le lactosérum acide est plus riche en condres. Quant à la matière grasse, elle est pratiquement absente du sérum acide car le lait destiné à la fabrication des pâtes fraîches est écrémé avant la mise en œuvre. Le fromage obtenu n'est enrichi en matière grasse qu'une fois séparé du lactosérum.

Les principaux composants du lactosérum donc sont :

a. Le lactose :

C'est le constituant le plus important du point de vue poids par rapport à l'extrait sec du lait et plus encore par rapport à l'extrait sec du lactosérum [7].

b. Les composés azotés :

70 à 75 % des protéines sont des protéines solubles (Albumine, Globuline, Protéase, Peptone et protéines mineures).

20 à 25% des matières azotés sont représentés par les acides aminés, l'urée et l'ammoniaque [6].

Tableau n°I.3 : composition du lactosérum en acides aminés [10].

- albumines :	- β lactoglobuline	(44 à 52%)
	- lactalbumine	(20 à 24 %)
	- sérum albumine	(5 à 7%)
- globulines :	- immunoglobulines	(12 à 16%)
	- lactotransferine	
- enzymes :	- lipase	
	- protéase	
	- phosphatase	
	- xanthine oxydase	
	- lactopeptidase	

c. La matière grasse:

La matière grasse du lait est retenue par le caillé dans la fabrication de fromages, cependant une certaine quantité est entraînée dans le sérum brut. Celle-ci est faible, mais le plus souvent dans les traitements industriels, le lactosérum est tout de même écrémé [11].

d. Les sels minéraux :

Toutes les matières minérales du lait se trouvent dans le lactosérum. Le lactosérum est une source importante de calcium et de phosphore [4].

e. Les vitamines :

On retrouve surtout les vitamines hydrosolubles du groupe B :

- vitamine B1 ;
- vitamine B2 ;
- vitamine B6 ;
- vitamine B5 ;
- vitamine B12 ;
- A. Pantothénique ;
- A. Folique ;

I.1.5 Valeur alimentaire et nutritionnelle du lactosérum:

La valeur nutritionnelle du lactosérum est due essentiellement au lactose, aux protéines solubles et aux vitamines. Le lactose est un sucre rare dans la nature. Le galactose qu'il contient est un composant essentiel dans la formation des cellules cérébrales, ce qui explique son importance pour le nourrisson. Il intervient aussi dans la fixation du calcium sur le squelette et joue un rôle préventif contre le rachitisme. Enfin, sa dégradation en acide lactique acidifie le pH de l'intestin grêle et le protège contre la prolifération de germes pathogènes. De plus, son pouvoir sucrant est faible par rapport au saccharose (42 contre 100) d'où son utilisation dans les produits diététiques [7].

Quant aux protéines, leur richesse en acides aminés essentiels leur confère un grand intérêt nutritionnel; la lactalbumine est exceptionnellement riche en tryptophane qui constitue 7% de sa composition, alors que les bonnes protéines n'en renferment que 2%. Bien que pourvue en lysine et en acides aminés soufrés, notamment la cystéine, les protéines solubles ont une qualité nutritionnelle supérieure à la caséine [1]. Un traitement thermique excessif entraîne la dénaturation des séroprotéines par déplissement de leur structure [17].

Elles précipitent à : [18]

- 65°C pour les immunoglobulines
- 70 à 80 °C pour les lactoglobuline et le sérum albumine
- 95°C pour les lactalbumines

La présence de nombreuses vitamines améliore la valeur nutritionnelle du lactosérum. De par leur caractère hydrosoluble, toutes les vitamines du groupe B y sont représentées, en particulier la riboflavine (B2) qui confère au produit sa coloration jaune verdâtre caractéristique. Ces vitamines sont relativement peu sensibles à la chaleur, un traitement thermique à 72 °C durant 15 secondes détruit seulement 10 à 25 % de vitamines sériques, dont la thiamine (B1) et le pyridoxine (B6) [19].

I.2 Pouvoir polluant et impact sur l'environnement :

Afin de déterminer l'impact des effluents, plusieurs paramètres sont mesurés :

- Le pH
- La DCO (Demande Chimique en Oxygène) : elle permet de quantifier la teneur en matière oxydable de l'effluent.
- La DBO₅ (Demande Biologique en Oxygène sur 5 jours) : c'est la mesure de la quantité de matière organique qui sera dégradée en 5 jours par des bactéries. C'est donc une mesure de la matière organique facilement dégradable.
- Le rapport DCO/DBO₅ : plus il sera petit, plus l'effluent sera facilement dégradé.
- L'équivalent habitant (EH) : Cela permet de comparer l'impact des effluents par rapport aux rejets domestiques. 1 EH = 57g de matière organique [12].

Tableau n° I.4 : Caractéristiques physicochimiques des différents effluents [12].

Type d'effluent	pH	Volume produit par litre de lait	DCO (g/L)	DCO/DBO ₅
eaux blanches	5,5 à 6,2	3 à 4	2 à 3	1,3 à 1,4
lactosérum	4,3	0,75	50 à 70	1,5
mélange eaux blanches+lactosérum	4 à 4,5	4 à 5	10 à 12	1,7 à 1,8
eaux usées domestiques	7 à 8	150 litres par eq/hab	0,8	1,9

Les eaux blanches et le lactosérum sont souvent traités ensemble. Néanmoins, le lactosérum a un impact environnemental beaucoup plus important puisqu'il a des teneurs en matière organique très élevées. Il faut savoir que 1l de lait transformé représente environ 60 g de DCO dont 50 g proviennent du lactosérum et seulement 10 g des eaux blanches.

Tableau n° I.5 : Normes de rejets des différents effluents et des eaux blanches [12].

	Normes pour rejeter ou épandre les effluents	Eaux blanches
DCO (mg/l)	120	2000 - 3000
DBO₅ (mg/l)	40	154 - 214
MES (mg/l)	30	300 à 1000
P total (mg/l)	-	20 à 100
N total (mg/l)	-	10 à 100
pH	5,5 à 8,5	4,5 à 7,5

Selon son origine, le lactosérum possède une DBO de 30 à 60 g/l (valeur moyenne 45 g/l). Sachant qu'un litre d'eau non polluée contient environ 0,01 g d'oxygène de 4500 litres d'eau propre pour se décomposer biologiquement [4].

Les effluents de fromagerie se caractérisent par une charge organique extrêmement élevée. C'est cette matière qui, concentrée dans les eaux ou les sols, provoque une pollution par asphyxie du milieu récepteur: pollution des petits cours d'eau, colmatage des sols autour des points de rejets. Outre l'impact sur le milieu naturel, les nuisances sont également olfactives et visuelles. Il faut également préciser que les eaux de lavage de la fromagerie, de la salle de traites mélangées aux sérums d'égouttage constituent une charge polluante 15 fois plus élevée qu'une eau usée ménagère. Le lactosérum représente à lui seul 70 % de la charge polluante. 1 litre de lait génère 4 à 5 litres d'effluent [4].

La DBO₅ d'une eau domestique est évaluée à 300 mg et elle est estimée à 200 litres le volume d'eau utilisé par habitant et par jour. Dans ce cas, un équivalent habitant est égal à 60 grammes d'oxygène, soit la DBO₅ d'un litre de lactosérum. L'auteur en conclut qu'un seul litre de lactosérum pollue autant que l'eau usée par une personne sur toute la journée. Ainsi; une fromagerie rejetant 1000 litres de lactosérum/jour pollue autant qu'une ville de 1000 habitants [14].

Les effluents des industries agro-alimentaires (laiteries), les matières "fermentescibles" ne sont pas directement toxiques mais elles entraînent de graves perturbations des cycles

biologiques et du milieu naturel lorsqu'elles sont en trop grande quantité: c'est l'eutrophisation.

Pour la mer; les effluents déversés sont également riches en sels nutritifs comme les nitrates, les phosphates, l'ammoniaque.

Les zones sensibles à la pollution microbiologiques (zones de pêche et d'élevage de produits conchylicoles), les zones de frayères et de nourriceries [15].

Les conséquences majeures des rejets industriels dans la nature provoquent des charges polluantes multiples : [16]

- Formation de films et de mousses qui empêchent la réoxygénation de la rivière (il s'y ajoute le développement superficiel des plantes aquatiques (eutrophisation) lié à l'apport de matières organiques);
- Infiltrations dans les terrains (essence);
- Empoisonnement de la flore et de la faune par les toxiques;
- Difficultés d'épuration dans les stations d'épuration biologiques en raison de l'inhibition des bactéries chargées de la réoxygénation;

I.3 Valorisation du lactosérum :

I.3.1 Utilisation à l'état liquide :

I.3.1.1 Alimentation animale :

La façon la plus directe de valoriser le lactosérum est de le donner sous forme de boisson aux animaux domestiques. En Europe, les élevages de porcs restent le débouché traditionnel du lactosérum liquide [20].

Grâce à sa richesse en lactose le lactosérum constitue la source énergétique la mieux adaptée aux besoins des jeunes mammifères comme le veau, capable de digérer rapidement le lactose. Dans le cas des vaches laitières l'introduction dans la ration doit être progressive pour permettre à la flore du rumen de s'adapter à l'apport important du lactose. D'après Girard (1982); un troupeau de vaches laitières qui disposeraient de lactosérum acide à volonté sous forme liquide consommerait 2 à 4 kg de matière sèche par jour (30 à 60 litres de lactosérum brut).

Cette consommation de lactosérum compense en outre une éventuelle insuffisance en quantité ou qualité des autres nutriments. Ainsi, suivant l'abondance des ressources fourragères dont il dispose. L'éleveur peut utiliser le lactosérum pour économiser des fourrages ou du concentré.

I.3.1.2 Boisson à base de lactosérum :

Le lactosérum est couramment utilisé dans les boissons, en particulier dans les pays de l'Est, en Allemagne et aux USA. Il n'est jamais consommé tel quel, mais mélangé avec à d'autres composants tel que le sucre, arôme, graisse végétale émulsifiants [11]. Ceux-ci permettent d'éliminer ou de masquer la saveur acide et fermentée caractéristique du lactosérum.

Les principales boissons au lactosérum sont : [22]

– le Freshi allemand : mélange de lactosérum et de jus de citron conditionné aseptiquement après upérisation. Comme son nom l'indique, c'est une boisson très rafraîchissement et de haute valeur diététique.

- la Kuzmina : boisson gazeuse composée de lactosérum, jus d'agrumes, sucre, acide citrique et vanille.

- Way-Mill : imitation du lait est composé de lactosérum doux ou acide, d'huile végétale, d'hydrocolloïdes végétaux, de lait écrémé et d'arômes.

–la Dway: mélange de lactosérum et de jus de fruit.

D'autres boissons de lactosérum sont confectionnées à partir de purée, jus ou concentré de fruits. Les meilleurs résultats sont obtenus avec le jus d'agrumes dont l'arôme est très compatible avec le lactosérum de type acide.

I.3.1.3 Milieu de culture :

Le lactosérum liquide, après modification est un excellent substrat de fermentation pour la production de protéines d'organismes unicellulaire (P.O.U) ou de métabolites: une fois déprotéiné, il peut servir à la production de levures de bactéries lactiques ou de produits dérivés de leur fermentation : alcool, acide lactique, vitamines, enzymes [23].

I.3.2 Utilisation sous forme concentrée :

La concentration du lactosérum a plusieurs avantages et cela dès qu'elle atteint 25 à 30 % de matière sèche: [20]

- elle stabilise le produit contre les dégradations bactériennes ;
- elle diminue le volume à transporter, ce qui permet de réduire le coût de transport et de maturation ;

Le produit concentré peut être utilisé :

- en alimentation animale: en particulier pour les porcs ce qui permet d'augmenter les quantités consommées par tête [11].
- en industrie alimentaire : pour la fabrication de confiserie à partir de lactosérum concentré sucré ou pour l'incorporation dans les mixes de crèmes glacés [17].

De manière générale, la concentration ne constitue qu'une étape intermédiaire avant le séchage, car malgré un investissement plus important la poudre de lactosérum est plus facile d'emploi sa durée de conservation est plus longue et son transport facilité.

I.3.3 Utilisation sous forme déshydratée :

Si l'on assimile le lactosérum à un lait dépourvu de caséine et de matière grasse, la poudre de lactosérum a une composition voisine de la poudre de lait écrémé. C'est pourquoi elle lui est souvent substituée dans des préparations destinées à l'alimentation humaine ou animale.

En alimentation animale, la poudre de sérum est fréquemment incorporée dans les aliments concentrés pour bovins; elle entre aussi dans la composition des laits d'élevage, ou lactoreplaceurs, dans des proportions variant de 20 à 30 % [20].

Dans le cas de la volaille, le sérum séché est distribué sous forme de granulés pour faciliter la prise de l'aliment et diminuer les pertes. Mais c'est l'alimentation humaine qui constitue le débouché le plus valorisant pour la poudre de lactosérum du moins en ce qui concerne le sérum doux. Les principaux secteurs utilisateurs sont :

- les industries de deuxième transformations des céréales pour la fabrication de pains, biscuits, gâteaux [24].
- la confiserie pour les bonbons, enrobages et chocolats ;
- l'industrie de la viande pour la confection des pâtés, merguez, cachir, etc. ... [25].
- la laiterie pour la préparation des fromages fondus ;
- les boissons et l'alimentation infantile [2], [8].

I.3.4 Lactosérum modifiée :

I.3.4.1 Déminéralisation :

Deux techniques peuvent être utilisées pour réduire le taux de sel minéraux du lactosérum :

- * l'électrodialyse ;
- * échange d'ions ;

Ces deux méthodes de déminéralisation tendent à se développer malgré les coûts d'investissement importants pour la première et des coûts d'exploitation élevés pour la seconde, qui est forte consommatrice de produits chimiques [26], [27]. Les lactosérums déminéralisés trouvent leurs principaux débouchés dans l'industrie des crèmes glacées, la confiserie et surtout dans les aliments infantiles.

En effet; la richesse en protéines et la faible teneur en cendres des lactosérums déminéralisés permet de corriger la composition du lait de vache pour le rapprocher du lait humain: on parle des laits maternisés.

I.3.4.2 Dé lactosage :

L'objectif du dé lactosage est la production du lactose.

Le procédé consiste à concentrer le lactosérum brut jusqu'à 65, 70% dans des évaporateurs à multiple effet sous vide.

Le lactosérum dé lactosé qui est un sous produit de l'industrie du lactose, il est le plus souvent séché avant d'être utilisé en alimentation animale, en tant que substitut de la poudre de lait écrémé pour veaux.

I.3.4.3 Extraction des protéines sériques :

Les grandes qualités nutritionnelles des protéines sériques poussent les industriels à les séparer du lactosérum pour mieux les valoriser.

Il existe deux types de séparation:

- une séparation destructive: consiste à flocculer les protéines sous l'effet conjugué de la

chaleur et de l'acidité, puis à les extraire par séparation centrifuge. Le lait de protéines obtenu est recyclé en fromageries pour augmenter le rendement fromager, tel est le principe du procédé centri-whey [9].

- une séparation non destructive : destinée à préserver toutes les qualités nutritionnelles et fonctionnelles des protéines (pouvoir émulsifiant, gélifiant, moussant). La méthode est basée sur l'ultrafiltration du lactosérum à l'aide d'une membrane semi-perméable et sous faible pression (1 à 7 bars). Les constituants de poids moléculaires supérieur à 5000 dalton sont retenus par la membrane : il s'agit de la matière grasse des protéines et d'une partie des sels minéraux qui constituent le retentât. Les autres composants (eau, sels minéraux lactose, azote non protéique) forment le perméat qui est éliminé. Le retentât une fois séché est utilisé pour enrichir en protéines de nombreux produits alimentaires. Sa richesse en lysine est tryptophane compense très bien les déficiences du blé en ces acides aminés. Pour cela les protéines sériques sont souvent utilisées pour compléter les produits céréaliers (biscuits, pain, gâteaux) et les aliments pour bébés.

I.3.4.4. Hydrolyse du lactose :

Pour améliorer le pouvoir sucrant et prévenir les problèmes de texture en hydrolyse le lactose en glucose + galactose.

Il existe deux voies d'hydrolyse:

- la voie chimique : consiste à attaquer à chaud le lactose par addition directe d'un acide fort. Cette méthode est moins appliquée car elle floccule les séroprotéines et impose après hydrolyse une neutralisation qui augmente la teneur en minéraux.
- la voie biochimique: elle est couramment employée. Elle fait appel à une enzyme B galactosidase, et utilisée à pH proche de la neutralité. Une fois l'hydrolyse réalisée, la lactase est détruite par chauffage, ce qui limite son emploi à une utilisation unique.

L'utilisation du lactosérum à lactose hydrolysé est régie par une réglementation plus souple selon les pays. Des études toxicologiques continuent d'être menées, en particulier pour vérifier l'innocuité du galactose [4]. Déjà, le Canada autorise sans limitation l'emploi des produits à lactose hydrolysé. En France, la législation est plus restrictive et n'autorise que les lactosérums hydrolysés par voie enzymatique dans certains produits (produits de la boulangerie, biscuiteries, desserts et confiseries) [28].

I.3.5 Les traitements du lactosérum :

I.3.5.1 Concentration :

Elle peut être obtenue par un traitement à la chaleur, par un concentrateur classique, ou par osmose inverse. La concentration en évaporateur est le procédé qui actuellement le plus employé. Il permet d'obtenir un prix de revient d'évaporation très intéressant [6]. L'osmose inverse est une technique plus poussée de la filtration. Elle est basée sur la séparation des molécules suivant leur taille.

I.3.5.2 Séchage :

Le séchage est obtenu soit par les cylindres chauffants soit par atomisation. Le séchage est l'étape qui suit l'évaporation dans le processus d'obtention de poudre facile d'emploi. Les techniques de séchage du lactosérum sont :

- ❖ le séchage sur cylindre
- ❖ le séchage en spray classique
- ❖ le séchage à billes

I.3.5.3 Extraction des éléments constitutifs :

Les protéines et le lactose font le plus souvent l'objet d'une extraction en vue de leur utilisation séparément. Les sels minéraux quant à eux constituent un obstacle à l'utilisation optimale du lactosérum, d'où la nécessité de la déminéralisation:

*** *séparation des protéines :***

elle est réalisée par :

- insolubilisation des protéines par la chaleur ;
- procédé centi-Whey ;
- précipitation par divers agents ;
- ultrafiltration et gel filtration ;

*** *Séparation du lactose :***

le processus est le suivant ;

- concentration ;

- cristallisation ;
- séparation des cristaux ;
- lavage, séchage, broyage ;

* **Déminéralisation** :

la charge minérale peut être trop importante pour son emploi en alimentation et son utilisation technologique.

La déminéralisation peut se faire par :

- échange d'ions ;
- électrodialyse ;

I.3.5.4 Traitements fermentaires :

Ils permettent l'utilisation du lactosérum comme milieu de culture.

I.4 Réglementation sur le lactosérum :

Le pouvoir polluant du lactosérum est dû à sa richesse en lactose (50 g/l) sucre rapidement métabolisable par les microorganismes en présence d'oxygène.

C'est pourquoi dans les grands pays laitiers, une réglementation sévère sur les rejets d'eaux résiduaires interdit aux fromagers d'éliminer leur lactosérum dans lui faire subir un traitement de dépollution.

En Europe, des agences financières de bassin contrôlent les effluents des industriels et leur imposent une taxe proportionnelle au degré de pollution.

Cette taxe est calculée sur la base d'une moyenne pondérée entre la demande biologique en oxygène (DBO) et la demande chimique en oxygène (DCO) [4].

En Algérie, aucune réglementation stricte n'a interdit le rejet direct du lactosérum dans la nature, et les sociétés laitières le réinjectent dans le lait à la place de la poudre du lait [29].

I.5 L'acide lactique :

I.5.1 Définition :

L'acide lactique est le produit final issu de deux types de la fermentation bactérienne:

- * Dans le vin: par la fermentation malolactique : l'acide malique, naturellement contenu dans le vin, est dégradé en acide lactique sous l'action des bactéries.

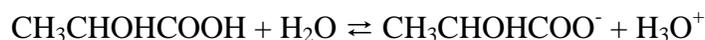
- Dans le lait et les produits laitiers: l'acide lactique provient de la dégradation du lactose par les bactéries. Plus un lait est frais, moins il contient d'acide lactique.

La concentration en acide lactique dans un lait s'exprime en degré Dornic (°D) : 1°D correspond à 0,1 g d'acide lactique par litre de lait. Un lait frais contient de 15 à 18°D, il caille à 60-70°D et les organismes responsables de l'apparition d'acide lactique sont les lactobacilles. [30]

I.5.2 Propriétés physico-chimique:

L'acide lactique est un acide organique (carboxylique) qui joue un rôle dans divers processus biochimiques, et le lactate est un sel de cet acide. Sa formule chimique est $C_3H_6O_3$ et sa structure se reflète dans son nom systématique, l'acide 2-hydroxy-propanoïque. Sa masse molaire est de 90g/mol.

Il est soluble dans l'eau et considéré comme un acide faible ($pK_a=3,90$), c'est-à-dire que la réaction de dissociation dans l'eau n'est pas totale : [30]



L'acide lactique existe en deux stéréo-isomères: l'acide L (+)- lactique (dextrogyre) et l'acide - D (-)-lactique (lévogyre) [31].

L'acide lactique donne aux laitages fermentés une saveur légèrement aigrelette caractéristique [35].

I.5.3 Utilisations :

L'acide lactique est utilisé dans plusieurs domaines :

A. l'industrie alimentaire :

Comme additif (E270) en tant qu'antioxygène, acidifiant ou exhausteur de goût. L'acide lactique se présente aussi sous forme de sels : sel de sodium (E325), de potassium (E326) et calcium (E327). Ses sels sont sous formes de poudre et sont également solubles dans l'eau. Il agit comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes comme la salmonelle (ou la listeria) et aussi un effet dépresseur d'activité de l'eau [33].

L'acidification des aliments présente plusieurs avantages: elle évite les fermentations secondaires, fait précipiter les protéines, ce qui rend les aliments plus digestes, et elle prolonge leur durée de conservation en inhibant l'activité des micro-organismes indésirables; elle contribue en outre au développement de l'arôme, ajuste le pH et active la vitamine C. Sur la base des chiffres du quatrième rapport sur la nutrition en Suisse et connaissant la teneur moyenne en acide lactique des produits laitiers, on estime la quantité d'acide lactique fournie par le lait et les produits laitiers à environ 360 g par habitant et par année [31].

B. le secteur pharmaceutique et médical :

L'utilisation méconnue concerne son pouvoir instantané dans le traitement de la douleur liée aux aphtes buccaux. Un simple contact avec un coton-tige imbibé d'acide lactique blanchit l'aphte et calme immédiatement la douleur. On peut se procurer de l'acide lactique dans certaines pharmacies. D'après des recherches ayant eu lieu au Québec, il semblerait que l'acide lactique soit un des moyens les plus naturels pour prévenir le cancer de la vessie; mais aussi celui de la peau [30].

C. la santé humaine :

En présence d'acide lactique l'organisme assimile mieux le phosphore et le fer. Dans le sang, l'acide lactique rééquilibre la balance acide-base, et donc les échanges d'oxygène et de minéraux avec les cellules. Il a une influence favorable en tant que régulateur de la respiration intracellulaire. Par ses qualités antiseptiques, l'acide lactique protège la muqueuse vaginale et intestinale des agents pathogènes. Ingérés par voie orale, les produits contenant du L (+)-lactate accélèrent la guérison du psoriasis et d'autres maladies de peau, ainsi que la disparition des croûtes de lait. Enfin; l'acide lactique a un effet régulateur sur la digestion [31].

I.6 Les bactéries lactiques :

I.6.1 Définition :

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, autonomes et procaryotes. Or sur ce dernier point les bactéries lactiques sont assez rudimentaires et indépendantes. Cependant, parmi les cellules procaryotes les bactéries lactiques peuvent être considérées comme relativement évoluées. Elles sont aussi hétérotrophes c'est pourquoi elles ont besoin de

sources de carbone relativement complexes afin d'élaborer leurs métabolites. De plus, les bactéries lactiques étant chimioorganotrophes ne peuvent se développer qu'en présence de substances hydrocarbonées [34].

Les bactéries lactiques sont classées en différents genres, selon la composition de leur paroi cellulaire, leurs caractéristiques biochimiques et génétiques (Stiles & Holzapfel, 1997). Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* sont majoritairement retrouvés dans les fromages [35]. Un certain nombre de micro-organismes, surtout des bactéries, vivent dans des conditions anaérobies en réalisant la fermentation lactique. Ainsi, le fait que le lait « tourne » est dû à la fermentation du lactose, réalisée notamment par des bactéries des genres *Streptococcus* et *Lactobacillus* [35].

Les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis quatre mille ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité [36]. L'utilisation des bactéries lactiques comme levain en fromagerie a été introduite par Weigmann en 1890 [37], principalement dans le but d'accomplir l'acidification du lait simultanément à sa coagulation. C'est pour cela qu'elles appartiennent à un groupe de bactéries bénéfiques, et qui produisent de l'acide lactique comme produit final du processus de fermentation. [32]

Les bactéries lactiques sont partout dans la nature, et se trouvent aussi dans le système digestif de l'homme. Elles interviennent dans la préparation des laitages fermentés, et sont utilisées également dans le saumurage des légumes, la boulangerie, la fabrication du vin, le saurissage des poissons, des viandes et des salaisons [32]. Elles améliorent la conservation, et agissent sur les textures et les saveurs qui se révèlent différentes de celles de l'aliment à son état original.

On distingue trois types de bactéries lactiques:

- bactéries homolactiques : retrouvées chez les Streptocoques ; c'est une fermentation sans production de gaz et s'accompagnant d'une diminution importante du pH du milieu [35]. Après fermentation donne un seul produit l'acide lactique [38].

- bactéries hétérolactiques facultatives : dite aussi acéto-lactiques ; retrouvées chez des bactéries du genre *Bifidobacterium*, s'accompagnent de la production d'un mélange d'acide lactique et acétique [35].
- bactéries hétérolactiques strictes : retrouvées chez les Lactobacilles, comprennent une production importante de CO₂ et un pH bas [35]. Après fermentation donne l'acide lactique et l'acide acétique ou éthanol [38].

On peut avoir une association de deux types de bactéries lactiques qui répondent au deux noms de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* (utilisées pour la fabrication du yaourt). Chaque une des deux bactéries stimule la croissance de l'autre. Ce lien symbiotique donne un produit différent des produits obtenus par les bactéries simples, prises séparément. Grâce à la symbiose des deux bactéries, la fermentation a lieu plus rapidement que s'il n'y avait qu'une seule espèce de bactérie [32].

I.6.2 Caractéristiques :

Du point de vue phylogénique, ces micro-organismes sont des bactéries à Gram-positif, généralement immobiles, catalase-négatives, asporulées, microaérophiles ou anaérobies facultatives mais aérotoles, en forme de coques ou de bâtonnets [37]. La fonction principale de ces bactéries est de dégrader le lactose, sucre majoritairement contenu dans le lait, pour produire de l'acide lactique (fermentation lactique).

Les bactéries lactiques ne possèdent ni nitrate réductase. En plus de cela, d'après Dellaglio (1994) ; les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole, ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine.

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les acides gras, les peptides, les vitamines, les glucides fermentescibles et les sels.

I.6.3 *Streptococcus thermophilus*:

La famille des *Streptococcaceae* comporte trois genres principaux: *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus* [39].

Cette famille a les caractéristiques suivantes :

- Petits coques à Gram positif, en chaînettes de longueur variable
- Immobiles (sauf rares entérocoques), non sporulés
- Aérobie, anaérobie facultatif
- Ne produisant pas de catalase

Elle contient 90 espèces, une dizaine d'importance médicale et trois pathogènes majeurs:

S. pyogenes; *S. agalactiae*; *S. pneumoniae*.

L'espèce *S. thermophilus* appartient à la règne bacteria, à la famille des *Streptococcaceae*, à la sixième classe du genre *Streptococcus*. Elle peut être isolée du lait à 45-50°C ou du lait pasteurisé, des produits laitiers : yaourt, du matériel de laiterie, des levains artisanaux [40]. *S. thermophilus* intervient dans la fabrication du yaourt. La température optimale de croissance est 45°C et il ne se développe pas au-dessous de 20°C [41].

Cette espèce se distingue essentiellement des autres streptocoques lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42-43°C, l'absence de tout antigène de groupe, sa thermorésistance à 60°C (parfois à 65 °C) pendant 30 minutes, une activité fermentaire le plus souvent réduite à quelques sucres et une forte sensibilité au NaCl [40]. Elle est capable de dégrader l'urée présente dans le lait en CO₂.

Les souches de bactéries lactiques *S. thermophilus* étant très exigeantes en matière de nutriments pour cela on utilise un milieu nutritif comme milieu de préculture. Elles coagulaient le lait écrémé en 3 h alors que la souche de référence CNRZ 302 demandait 10 h. La forte vitesse d'acidification de ces souches était corrélée avec une activité protéinase. Ces hautes activités protéinases ont été observées en milieu M17. Pour cela le lait écrémé et le M17 sont jugés être de bons milieux de préculture [42], [43].

S. thermophilus possède des propriétés voisines de celles des streptocoques lactiques type N qui possèdent trois espèces : *S. lactis* , *S. cremoris* et *S. diacétillactis* [41].

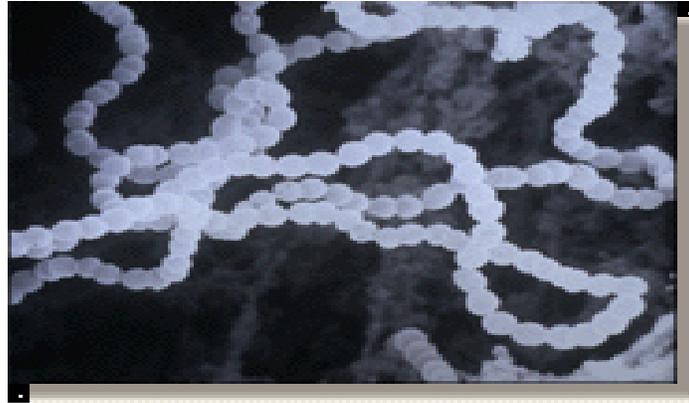


Figure n°I.3: S. thermophilus en chaînettes [52]

I.6.4 Mécanisme de dégradation du lactose en acide lactique par les bactéries lactiques – la nutrition glucidique :

La fermentation lactique commerciale remonte à l'an 1881, et les caractéristiques des bactéries lactiques sont bien reconnues. [47]

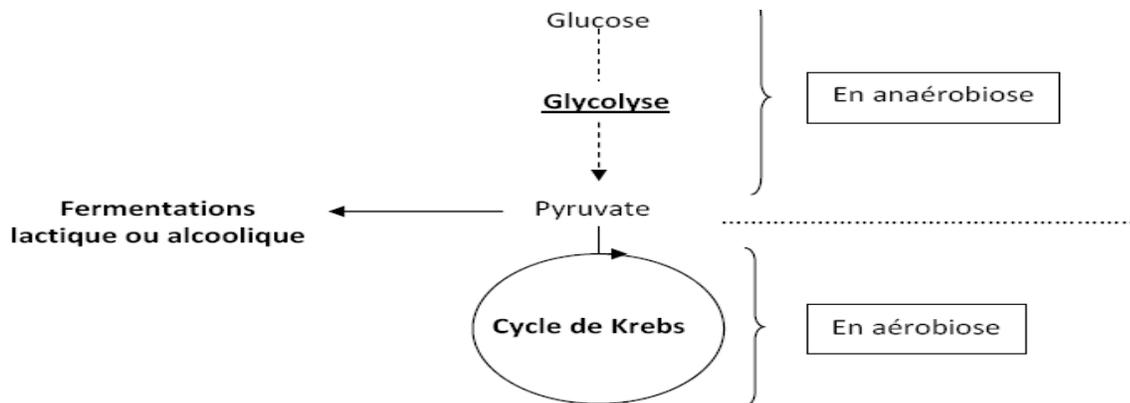


Figure n°I.4 : Voies de dégradation des bactéries aérobies et anaérobies [45].

D'après Michel Desmazeaud, 1983 et René Scriban, 1999; le mécanisme de transport du lactose suit la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas et le processus se décrit comme suit :

Le transport des sucres (lactose) à travers la membrane cellulaire, met en jeu un système phosphotransférase, phosphorylant le lactose, le glucose ou le galactose, aux dépens de phosphoénol pyruvate (PEP).

Le lactose-phosphate est dégradé par une phospho- β -galactosidase, puis le glucose en résultant, suivant la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Pour aboutir à la

formation de deux moles d'acide lactique et deux moles d'ATP. Le galactose-6-phosphate est catabolisé selon la voie du D-tagatose-6-phosphate

Le galactose est dégradé selon la voie de Leloir. Le métabolisme des sucres est soumis à une régulation par des mécanismes de répression et de rétroinhibition. En présence de différents sucres, la bactérie va les cataboliser successivement, dans un certain ordre. Des plasmides sont associés à certaines étapes du métabolisme du lactose.

Le pyruvate peut être à l'origine de produits autres que le lactate. Les différentes étapes du métabolisme ont été précisées. De même, l'utilisation du citrate est désormais bien précisée. Son métabolisme serait aussi lié à un plasmide.

Enfin, l'acide lactique produit à la fin de ces métabolismes est de configuration L(+) qui se trouve être la forme la plus digestible [47].

I.6.5 La nutrition azotée :

Les bactéries lactiques sont incapables d'en effectuer la synthèse des acides aminés à partir d'une source azotée plus simple alors elles exigent la fourniture exogène pour leur croissance[46].

La fraction azotée non protéique du lait est en fait une source importante d'azote pour les bactéries lactiques.

Des phénomènes de transport de différents peptides ont aussi été mis en évidence. Les protéines du lait sont utilisées grâce à des protéinases liées à la paroi sous l'influence des ions calcium. D'autre part, elles possèdent un riche équipement en aminopeptidases liées aux membranes, en protéinases et en diverses exopeptidases intracellulaires. La perte simultanée de la fermentation du lactose et de l'activité protéinase suggère que ces caractères sont liés, et peuvent résider sur un même plasmide.

Enfin, les bactéries lactiques exigent un certain nombre de vitamines, de bases azotées et de minéraux. Dans certains cas, le gaz carbonique serait essentiel pour leur croissance [46].

I.6.6 Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont caractérisées par des exigences nutritionnelles nombreuses. Elles ne peuvent donc croître que dans des milieux riches en vitamines, bases

nucléiques et en sources de carbone et d'azote : lait, produits laitiers végétaux en décomposition, viandes,...les vitamines nécessaires à leurs croissance sont généralement présent dans le lait à concentration suffisante mais l'ajout par exemple de l'extrait de levure améliore la croissance bactérienne [40].

I.6.7 Cinétique de croissance bactérienne :

Le développement d'une culture microbienne est habituellement représenté à l'aide d'un graphique donnant le nombre de bactéries ou mieux le logarithme de ce nombre en fonction du temps : C'est la courbe de croissance. Elle rend compte du cours de développement de la culture considérée. Celui-ci reflète l'interaction de la population bactérienne en voie de croissance et du milieu.

Après inoculation du milieu, six phases principales se distinguent dans toute courbe de croissance (**fig. I.5**) :

L'étude de la cinétique de la culture discontinue (en batch) de *S. thermophilus* ou le milieu est non renouvelé, sur un substrat carboné (lactose), avec production d'un métabolite inhibiteur (acide lactique), donne la même courbe de croissance qui peut être interpréter comme suit: [49], [50]

a) phase de latence:

Pendant cette période le taux de croissance est nul puis augmente légèrement. Elle traduit l'adaptation des bactéries au milieu et permet donc la synthèse ou l'activation du milieu et elle est sous l'influence de plusieurs facteurs :

- les conditions physico-chimiques du milieu : pH, température...
- les caractères propres des bactéries notamment leur état physiologique,
- la composition du milieu : lorsque la population bactérienne ne trouve pas dans le milieu les facteurs de croissance indispensables, elle est incapable de se développer. La croissance ne peut alors débuter que si l'inoculum contient des cellules mutantes, c'est-à-dire présentant brusquement une modification d'un caractère transmissible héréditairement.

Selon ces facteurs, la phase de latence peut être plus ou moins longue (de deux à trois heures à plusieurs jours).

Pour *S. thermophilus* cette phase permet d'une part l'activation de la lactose perméase et d'autre part l'induction de la synthèse de la B. galactosidase, par le lactose présent dans le milieu.

a) phase d'accélération:

μ augmente pendant lequel le métabolisme cellulaire reprend et la croissance démarre.

b) phase exponentielle ou logarithmique:

Les bactéries se multiplient sans entrave ; le taux de croissance est maximum (μ_m) et constant :

$$\mu_m = (\log X - \log X_0) / (t - t_0)$$

La représentation graphique de $\log X$ en fonction du temps correspond à une droite de pente constante (μ).

Dans le cas des bactéries thermophiles, la pente de la droite représentant la phase exponentielle est habituellement plus forte que pour les mésophiles et plus faible pour les psychrophiles et les psychotrobes.

c) phase de ralentissement:

Le taux de croissance μ diminue.

d) phase stationnaire:

Le milieu devenant de moins en moins favorable à la croissance, le nombre de cellules viables reste constant à sa valeur maximale et le taux de croissance est nul ($\mu=0$).

Il peut avoir plusieurs causes : épuisement en nutriments (sucres, acides aminés,...), accumulation de déchets toxiques (acide lactique), conditions d'environnement devenant défavorables (pH, température...).

e) phase de décroissance ou de déclin:

$\mu < 0$, pendant cette dernière phase les bactéries ne se reproduisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont décomposées plus ou moins rapidement par les enzymes libérées au moment de leur mort. Ce processus d'autodigestion constitue l'autolyse.

Courbe de croissance en milieu non renouvelé

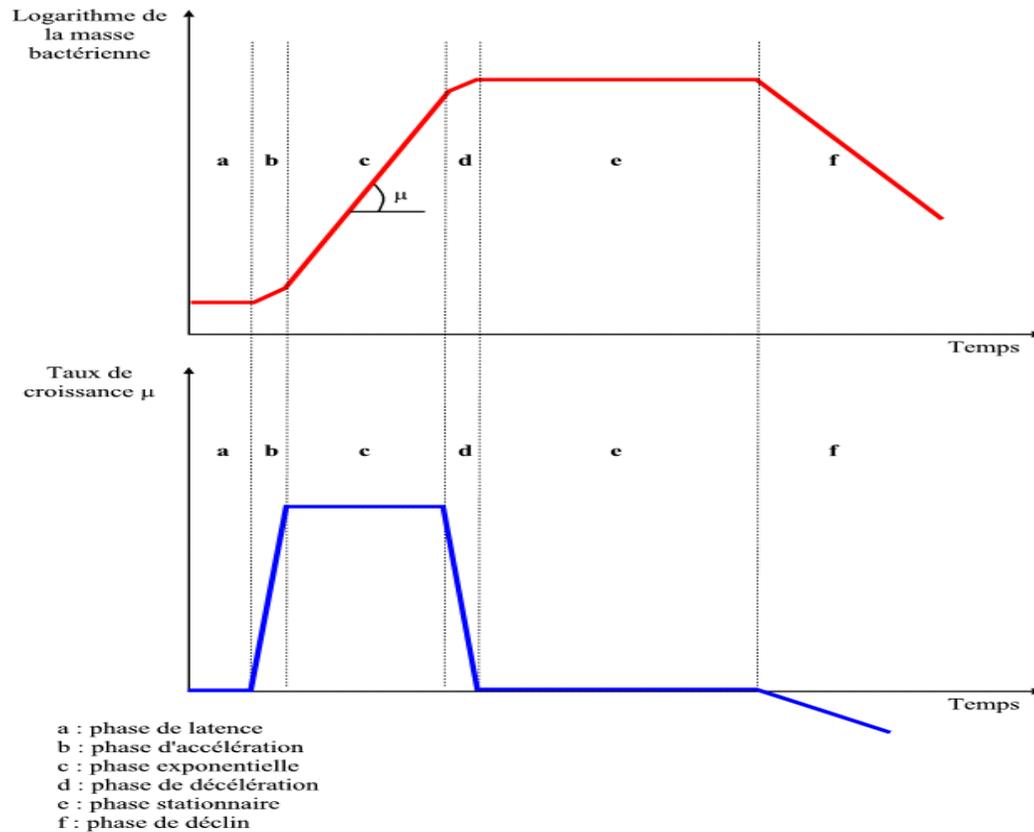


Figure n°I.5 : phases de croissance d'une culture bactérienne discontinue : [52]

- (a) Evolution d'une population cellulaire en fonction du temps de cellule.
 (b) Evolution du taux de croissance en fonction du temps de cellule.

I.6.9 Paramètres de croissance:

La croissance d'une bactérie peut être définie par deux constantes : [49], [51].

❖ **le temps de génération:**

C'est-à-dire l'intervalle de temps entre deux divisions successives ou celui nécessaire au doublement de la population. En partant d'une cellule bactérienne unique, ce dernier se fait selon une progression géométrique. Dans une population bactérienne toutes les cellules ne se développent pas au même rythme. Le temps de génération varie avec l'espèce considérée et les conditions de culture. Sa formule est : $t_g = t/n$ avec : t : temps de multiplication (min)

n : nombres de division

- ❖ **le taux de croissance:** C'est le nombre de division par unité de temps. Autrement dit, il est l'inverse du temps de génération [49].

CHAPITRE II

Matériels et méthodes



Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1 Matériels :

II.1.1 Matériel biologique :

La souche utilisée dans notre étude est *Streptococcus thermophilus* S17, provenant de la collection du laboratoire LSTE de l'ENSP.

II.1.2 Milieu de culture :

Le lactosérum servant à la constitution de milieu de fermentation provient de la laiterie d'Ouled Fayet. Il s'agit d'un lactosérum doux, issu de la fabrication du fromage de type Camembert.

Le prélèvement se fait à l'usine, au moment de la séparation du lactosérum du reste du caillé, avant son rejet à l'égout. Les échantillons sont recueillis stérilement dans des flacons en verre. Ces derniers sont acheminés au laboratoire dans une glacière portative. Ce lactosérum doit subir une déprotéinisation avant le lancement de la fermentation.

II.1.3 Produits et matériel utilisés :

- Les réactifs utilisés pour le dosage du lactose et de l'acide lactique ainsi que pour la détermination de la DCO sont cités en **annexe n°1**.
- Les différents matériels utilisés sont résumés en **annexe n°2**.

II.2 Méthodes d'analyse :

II.2.1 Déprotéinisation du lactosérum:

Le lactosérum est déprotéiné par précipitation et filtration selon la technique de Moulin et Al., (1976). Cette méthode est partielle et elle est spécifique aux caséines. Avant de procéder à la filtration, l'échantillon est préalablement acidifié jusqu'au pH=4,6 à l'aide de l'acide sulfurique concentré. Ce pH correspond au point isoélectrique des protéines (caséines); l'échantillon est ensuite chauffé à 100 °C pendant 5 min dans un autoclave. Après refroidissement, on filtre sur un papier filtre simple. L'opération est effectuée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide.

La stérilisation du lactosérum s'effectue dans un bain marie à 100 °C pendant 10 min deux fois successives après ajustement du pH à 7.

II.2.2 La fermentation :

II.2.2.1 Préparation de la préculture :

En premier lieu la souche conservée au réfrigérateur à 4°C est revivifiée par repiquage sur du lait écrémé (10%) autoclavé. Avant l'ensemencement du milieu de préculture, on effectue deux repiquages de la manière suivante :

Un prélèvement stérile près du bec benzène à l'aide d'une pipette Pasteur est effectué en introduisant la souche (1%) dans un tube de 10 ml de lait suivi d'une incubation à 42°C pendant 16 h. Le deuxième repiquage se fait de la même manière mais en prélevant à partir de cette première préculture et l'ensemencement se fait sur bouillon M17 spécifique des bactéries lactiques thermophiles. Le tube est ensuite incubé à l'étuve à 42°C. Ce milieu va servir à inoculer le milieu de culture.

II.2.2.2 Préparation et lancement de fermentation :

La fermentation se déroule dans des erlens d'une capacité de 1 litre contenant 600 ml de lactosérum déprotéiné en présence d'une faible agitation et en absence d'aération. Après stabilisation de la température à 42 °C, le milieu de culture estensemencé par 15 ml du milieu de préculture (les 5 ml restants servent à mesurer la taille de l'inoculum par lecture de la DO à 600 nm). Les erlens sont ensuite incubés dans un bain marie réglé à 42 °C.

II.2.3 Mesure de la croissance bactérienne :

➤ Analyse turbidimétrique :

La densité de biomasse a été déterminée au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 600 nm et en se référant à un blanc ne contenant que le milieu de culture. La mesure de la densité optique doit être inférieure à 1,3 pour pouvoir appliquer la loi de Lambert - Beer. La valeur de la DO est ensuite convertie en poids cellulaire sec par le biais d'une courbe d'étalonnage présentée en annexe dont l'allure est une droite d'équation :

$$X \text{ (g/l)} = 0,8861 * DO \quad \text{avec : X : la biomasse en g/l.}$$

Des prélèvements stériles sont effectués toutes les deux heures afin de suivre l'évolution des souches dans le milieu de culture.

II.2.4 Détermination du pH :

La détermination du pH a été faite grâce à un pH-mètre par la méthode potentiométrique [53].

II.2.5 Dosage du lactose:

Le dosage est effectué selon la méthode de Bertrand sur le lactosérum brut (avant déprotéinisation) et lactosérum déprotéiné [54].

* *Défécation:*

Dans une fiole jaugée on introduit successivement 20 ml de lactosérum avec une pipette, 2 ml de solution de ferrocyanure de potassium. Après agitation; on ajoute 2 ml de solution d'acétate de zinc et on agite. Puis on complète au trait de jauge avec l'eau distillée. On ajoute ensuite 2 ml d'eau distillée pour tenir compte du volume de précipité. Après agitation ; on laisse reposer dix à quinze minutes et on filtre. On recommence la filtration jusqu'à l'obtention d'un filtrat absolument limpide.

* *Réduction :*

On introduit dans une fiole conique successivement 10 ml du filtrat obtenu par défécation exactement mesurés, 10 ml d'eau distillée, 20 ml de solution cuivrique et 20 ml de solution tartroalcaline.

On porte le mélange à ébullition modérée et on maintient celle-ci pendant trois minutes exactement. Ensuite; on refroidit immédiatement le contenu de la fiole sous un courant d'eau froide et on laisse déposer le précipité d'oxyde cuivreux formé. Le liquide surnageant doit demeurer de couleur bleu. Dans le cas contraire, on recommence la détermination sur une dilution plus approchée.

* *Lavage et dissolution de l'oxyde cuivreux:*

On verse le liquide surnageant sur le filtre en activant la filtration par aspiration. Il faut éviter d'entraîner le précipité sur le filtre et de le laisser au contact de l'air. Puis; on lave trois fois le précipité d'oxyde cuivreux avec 20 ml d'eau distillée bouillie froide, on décante et on filtre à chaque fois le liquide sur le filtre. Ce filtrat est rejeté.

On dissout ensuite le précipité par une quantité suffisante de solution ferrique (20 à 30 ml). On filtre la solution obtenue sur le même filtre en ayant soin de dissoudre complètement tout le précipité et de recueillir le filtrant dans une fiole conique à filtrer propre. On rince la fiole et le filtre avec trois fois 20 ml d'eau distillée bouillie froide.

* *titrage du sel ferreux formé:*

On ajoute à ce dernier filtrat une goutte d'orthophénantroline ferreuse et on titre par la solution de permanganate de potassium.

Le virage est obtenu lorsque la couleur passe du brun orangé au vert foncé.

Remarque : toutes les analyses sont effectuées en double

* **expression des résultats :**

La teneur en lactose, exprimée en gramme de lactose hydraté par litre de lactosérum, est égale à M et elle est lue sur le tableau de Bertrand (**Annexe n° 3**) en fonction du volume V de solution de permanganate de potassium nécessaire.

II.2.6 Dosage de l'acide lactique :

Ce dosage a été effectué selon la méthode dite 'l'acidité titrable qui exprime le nombre de grammes d'acide lactique présents dans un litre de lactosérum. Son principe est basé sur le titrage de l'acidité par l'hydroxyde de sodium (NaOH), en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré [54].

* **Mode opératoire :**

Dans un bécher de 100 ml, on introduit 10 ml de lactosérum auquel sont rajoutés 4 gouttes de la solution de phénophtaléine (1% dans l'éthanol à 95%). On titre par la solution d'hydroxyde de sodium 0,111 N (soude Dornic), jusqu'à début de virage au rose, facilement perceptible par comparaison avec un témoin constitué du même lactosérum. On considère que le virage est atteint lorsque la coloration rose persiste pendant une dizaine de secondes.

*** Expression des résultats:**

l'acidité peut être exprimée de différentes manières :

a) l'acidité, exprimée en gramme d'acide lactique par litre de lactosérum, est égale à :

$$\text{Acidité (g d'ac.lactique)} = V_1 \times 0,01 \times 1000 / V_0$$

Ou: V_0 est le volume, en millilitres, de la prise d'essai;

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium

0,111 N nécessaire;

Si l'on utilise une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N, le résultat ci-dessus doit être multiplié par 0,9.

b) l'acidité, exprimée en gramme d'acide lactique par 100 grammes de lactosérum, est égale à :

$$\text{Acidité (g d'ac.lactique)} = V_1 \times 0,01 \times 100 / E$$

Ou: E est la masse, en gramme, de la prise d'essai;

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de sodium 0,111 N nécessaire;

Si l'on utilise une solution d'hydroxyde de sodium 0,1 N, le résultat ci-dessus doit être multiplié par 0,9.

II.2.7 Mesure de la DCO:**II.2.7.1 Définition:**

La demande chimique en oxygène (DCO) est la concentration en poids d'oxygène équivalente à la quantité de dichromate consommée par les matières dissoutes et en suspension lorsqu'on traite un échantillon d'eau avec cet oxydant dans des conditions définies.

II.2.7.2 Principe:

La méthode pratiquée est la méthode au bichromate de potassium dont le principe est le dosage colorimétrique du chrome trivalent formé au cours de la

réaction d'oxydoréduction dans des conditions bien définies: milieu fortement acide (H_2SO_4), à chaud (température 150°C) et pendant 2 heures et en présence d'un catalyseur (sulfate d'argent). L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ réduit. La concentration de la DCO de l'échantillon, exprimée en mg/l O_2 , est déduite, en se référant à une courbe étalon dressée à partir d'une série de solutions standard [55].

II.2.7.3 Mode opératoire :

1. Préparation du blanc: introduction 2,5 ml d'eau distillée dans un tube contenant les réactifs préparés (1,5 ml de la solution de digestion + 3,5 ml du réactif acide) ;
2. Prendre 2,5 ml de la solution de digestion + 3,5 ml du réactif acide dans des tubes spécifiques et on met ensuite 2,5 ml de l'échantillon, après le mélange les tubes doivent être immédiatement bien fermés afin d'éviter toute évaporation suite à un fort échauffement du à une réaction exothermique ;
3. Bien agiter les tubes au vortex.
4. Mettre les tubes ensuite à chauffer à 150°C pendant 2 heures, dans un bloc chauffant.
5. Laisser refroidir ensuite pendant environ 20 minutes.
6. Lire au spectrophotomètre la valeur de l'absorbance de l'échantillon après avoir fait le zéro avec le blanc à la longueur d'onde de 600 nm.

La concentration de la DCO de l'échantillon, exprimée en mg/l O_2 , est déduite, après mesure de la DO à 600 nm, de l'équation de la courbe d'étalonnage présentée en annexe n° 4.

II.2.8 Mode opératoire:

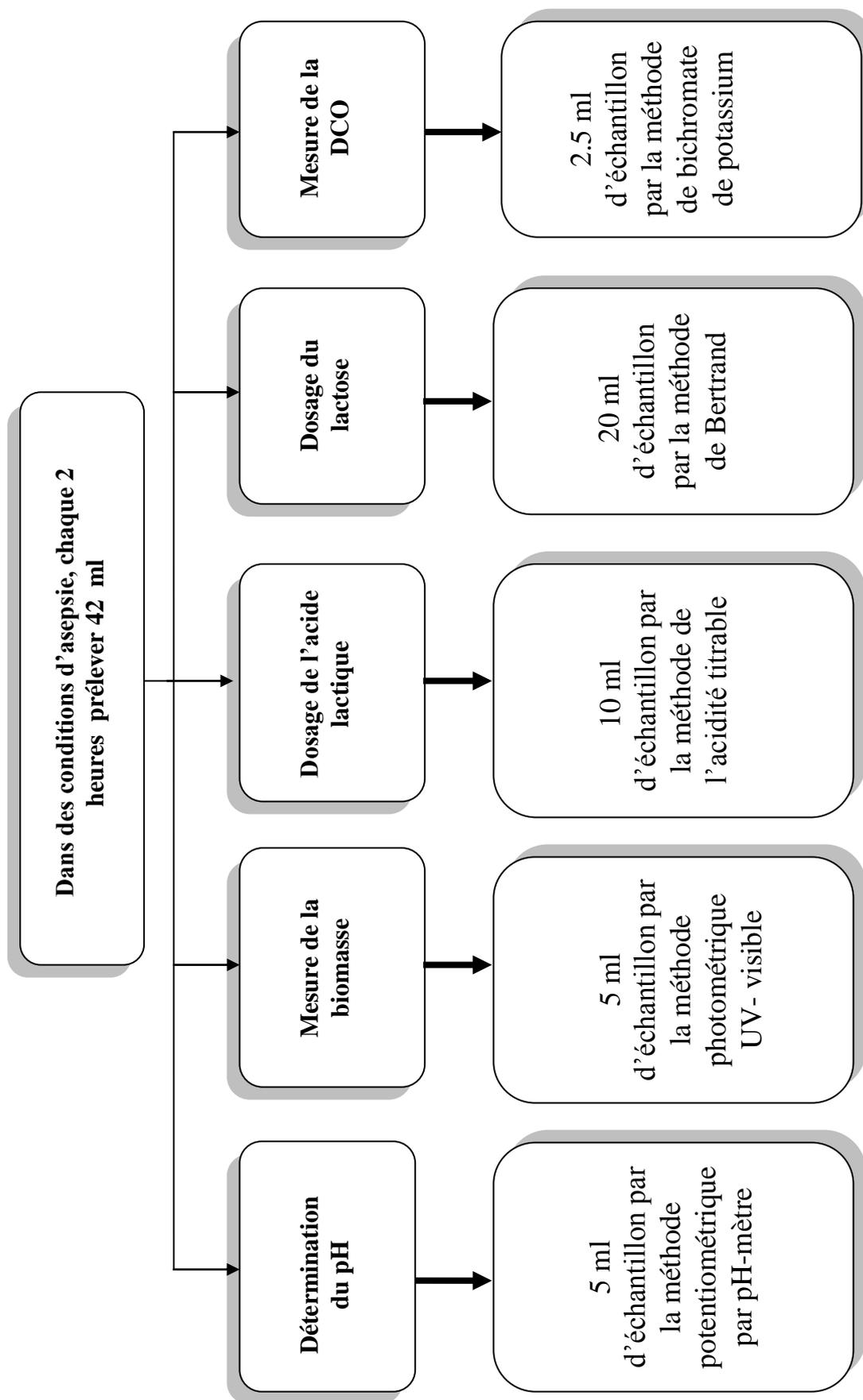


Figure n° II.1 : mode opératoire

II.2.9 Coloration de Gram :

II.2.9.1 Principe :

Les bactéries sont colorées par une première solution colorante, le violet de gentiane, puis elles sont fixées par un mordant, la solution de Lugol (solution d'iode dans l'iodure de potassium) qui va former un complexe avec violet de gentiane, ce qui permet de fixer la couleur à l'intérieur de la cellule. On fait ensuite agir un décolorant, l'alcool va dissoudre les graisses, c'est-à-dire les phospholipides.

Suivant la composition de leur paroi :

- certaines bactéries résistent à cette décoloration et apparaissent colorées en violet elles sont dites Gram positif.
- d'autres bactéries ne résistent pas et ne sont plus visibles. On doit donc utiliser un deuxième colorant de teinte contrastante (fuchsine). Ces bactéries apparaissent alors colorées en rose, elles sont dites Gram négatif.

II.2.9.2 Mode opératoire :

La coloration est en 4 temps principaux :

Etape 1 : réalisation d'un frottis qui est séché et fixé.

- On dépose au centre de la lame 1 goutte à partir d'un bouillon de *S. thermophilus* ; étaler.
- Laisser sécher en chauffant légèrement la lame au-dessus de la flamme. La lame doit être totalement sèche.
- Laisser refroidir.

Etape 2 : coloration au violet de Gentiane suivie d'un mordantage par une solution iodo-iodurée de Lugol.

- Recouvrir toute la lame de violet de gentiane. Laisser 1 minute.
- Chasser le violet avec le Lugol. Laisser 1 minute.
- Rincer immédiatement à l'eau. Egoutter la lame.

Etape 3 : décoloration à l'alcool

- Recouvrir la lame d'alcool 100°. Attendre 15 secondes.
- Rincer immédiatement à l'eau. Laisser un peu d'eau sur la lame.

Etape 4 : recoloration à la fuchsine

- Mettre 2 gouttes de Fuchsine. Laisser 1 minute.
- Laver abondamment à l'eau.
- Sécher délicatement la lame dans un papier jetable. Nettoyer au besoin le dessous de la lame avec un papier jetable. La lame doit être totalement sèche.
- Observer à l'immersion en pleine lumière : Mettre une goutte d'huile à immersion sur lame totalement sèche. Observer à l'objectif x100 (objectif à immersion).
- L'objectif doit toucher la goutte d'huile.

CHAPITRE III

Résultats et discussions



Chapitre III. Résultats et discussions

III.1 Caractérisation du lactosérum d'Ouled Fayet:

Quelques tests caractérisant le lactosérum issu de la laiterie d'Ouled Fayet sont présentés sur le tableau n° III.1

Tableau n°III.1: Caractérisation du lactosérum de la laiterie d'Ouled Fayet

lactosérum	Avant filtration (brut)	Après filtration et stérilisation
pH	5,6 - 6	6,2 – 6, 5
Teneur en lactose (g/l)	14,8 - 16	7,75– 14,6
Teneur en acide lactique (°D)	20 - 22	2 - 16
DCO mg/l	18500	11100

Le pH qui est un paramètre caractérisant un grand nombre d'équilibres physico - chimiques et dépend de facteurs multiples, dont l'origine est l'eau. La valeur moyenne trouvée du pH est comprise entre 5,6 et 6.

Selon la norme indiquée sur le tableau n°I.7 la valeur du pH doit être comprise entre 6,5 et 8,5 dans tous les cas de rejets en milieu naturel. Et les valeurs trouvées légèrement inférieures.

Avant utilisation le lactosérum brut est d'abord déprotéiné par précipitation et filtration dans le but d'éliminer les protéines de haut poids moléculaire. En effet, les protéines que contient le lactosérum filtré sont plus assimilables, elles sont principalement constituées de protéines hydrosolubles (de la β lactoglobuline et de α lactalbumine) dont le poids moléculaire est inférieur à 20.000 Dalton, les caséines ont été retenues au niveau du filtre, vu leur poids moléculaire élevé.

Après déprotéinisation du lactosérum, le pH a été ajusté à 7 juste avant la stérilisation. Après traitement thermique, le pH a légèrement diminué. Une légère dégradation du lactose de 14,16 g/l à environ 10 g/l est expliquée par une hydrolyse partielle par la chaleur. Tandis que l'acidité était de 20 à 22 °D à l'état brut et une quantité est perdue lors de la filtration, à la fin de la déprotéinisation on obtient des valeurs comprises entre 2 et 16 °D.

La demande chimique en oxygène du lactosérum brut est de 18500 mg/l d'O₂. Après traitement cette valeur passe à 11100 mg/l d'O₂ donc 7400 mg/l d'O₂ ont servi à la dégradation d'une partie mineure de la matière organique du lactosérum lors de la filtration et la stérilisation. Pour tout rejet dans un milieu naturel, la norme [14] préconise une DCO de 120 mg/l, ce qui montre le degré polluant du lactosérum.

III.2 Coloration de Gram :

Dans le but de vérifier la pureté de la souche étudiée *S. thermophilus* S17, nous avons réalisé une coloration de Gram. L'observation au microscope optique permet la visualisation de la bactérie qui demeure colorée violette, de Gram positif, sous forme de coques et en chaînettes. La figure ci-après illustre cette observation.

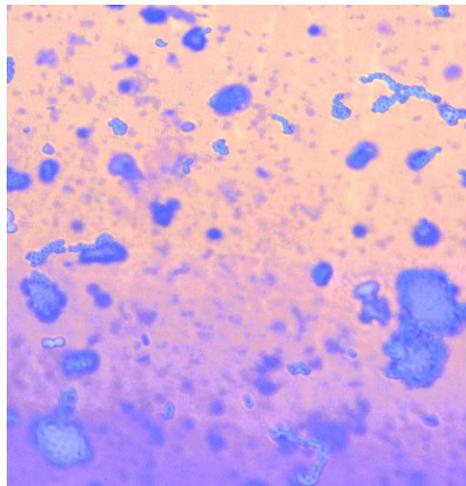


Figure III.1 : Observation au microscope optique (objectif × 100)

III.3 Comportement de *S. thermophilus* sur le milieu à base de lactosérum déprotéiné:

Les conditions opératoires ont été fixées par rapport à l'étude de Aliane [47], il s'agit d'une température de 42°C et l'absence d'aération, en plus d'une faible agitation.

L'expérience a été réalisée dans un milieu de culture ne contenant que du lactosérum déprotéiné et avec un pH acide libre.

III.3.1 Evolution de la biomasse:

D'après la figure III.2, nous remarquons que l'allure de l'évolution de biomasse obtenue correspond bien à la courbe de croissance bactérienne où on obtient quatre phases :

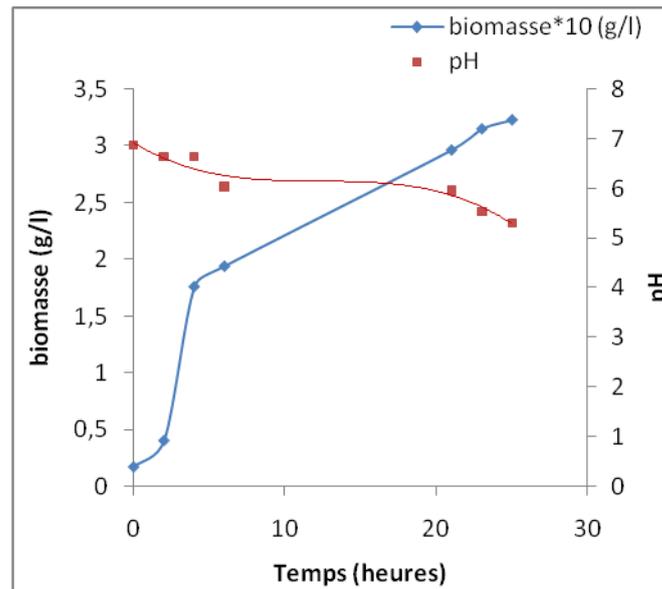


Figure n°III.2 : Evolution du pH et de la biomasse sur lactosérum déprotéiné.

$$T^{\circ} = 42^{\circ}\text{C}, DO \text{ inoculum} = 0,682.$$

La phase de latence est inexistante car *S. thermophilus* a été adaptée auparavant par une préculture sur du lait écrémé et donc au substrat qui est le lactose.

Donc, la croissance a commencé par une phase d'accélération rapide qui a duré moins de 2 heures. Le taux de croissance augmente et le métabolisme cellulaire démarre. Après, on remarque une évolution très progressive qui correspond à la phase exponentielle qui dure aux alentours de 4 heures, cette croissance s'explique par la consommation rapide du substrat (lactose) présent dans le milieu par la bactérie permettant une multiplication exponentielle.

Durant cette phase, μ atteint μ_{\max} qui peut être calculé par la formule:

$$\mu_m = (\log X - \log X_0)/(t - t_0)$$

Avec : X : la biomasse (g/l).

Le taux de croissance déterminé est de $0,317 \text{ h}^{-1}$, légèrement inférieur à celui trouvé par Aliane pour une autre espèce de *S. thermophilus* [47], qui est de $0,41 \text{ h}^{-1}$ et il est supérieur à celui trouvé par Boudjema (2004) qui a trouvé $0,155 \text{ h}^{-1}$.

Une phase de ralentissement est observé commence après 6 heures de fermentation, pendant cette phase μ décroît, ce qui explique que le substrat (lactose) a diminué dans le milieu.

Le palier peut être expliqué par une accumulation du galactose qui est excrété hors de la cellule et qui est accumulé dans le milieu. Ce sucre est considéré comme un inhibiteur compétitif de la β galactosidase et ralentit donc l'hydrolyse du lactose [50].

Les trois points obtenus pour les intervalles de temps successivement : 22, 23, 25 heures ne sont pas significatifs car la densité optique mesurée était supérieure à 1,3 donc ; la loi de Lambert-Beer n'est pas applicable pour pouvoir convertir ces densités en poids cellulaire sec. De plus, en fin de croissance, il y a mortalité des cellules qui sont considérées dans la lecture de la turbidité.

A titre comparatif, les travaux réalisés par Aliane [47] sur la même espèce *S. thermophilus*, ont montré un accroissement de 85% pour une durée de 8h. Nous avons obtenu un accroissement de 90,9 % en 6heures seulement et la biomasse à ce moment est de 1,94 g/l.

Selon l'étude de Boudjma (2004), on constate que la croissance à 42°C atteint une valeur de 0.965g de matière sèche / litre de milieu de culture. Donc, il est important que la température de fermentation soit le plus possible maintenue constante pour donner une meilleure croissance et production, car un brusque changement de température peut causer des perturbations [59].

Accolas et al. (1977), Radke-Mitchell et Sandine (1986), Bensiamer (1996) et Boubechiche (1999) ont également signalé que la température de 42°C est optimale pour la souche *S. thermophilus* CNRZ302.

En plus, Robinson (1988) a préconisé cette température d'incubation pour les souches de *S. thermophilus* en suivant comme critère d'acidification l'acidité titrable. Selon Bourgeois et Larpent (1996), *S. thermophilus* se distingue essentiellement des autres streptococcus lactiques par sa croissance thermophile avec un optimum autour de 42°C – 43°C. De même, Gyosheva et al. (1995) ont travaillé sur 75 souches de *S. thermophilus* et ont trouvé la température 42°C comme température d'incubation pour ces dernières.

III.3.2 Evolution du pH:

L'évolution du pH confirme la croissance bactérienne et la production de métabolites acide (acide lactique) conduisant à un abaissement du pH.

Au cours de la croissance de la bactérie, le pH décroît indiquant une production de l'acide lactique ce qui traduit une dégradation du lactose.

On a observé une diminution de pH de 6,86 à 5,32 au bout de 25h et on note donc une variation importante du pH, de l'ordre de 22,45 %. Ce qui traduit une bonne activité bactérienne qui a fait abaisser le pH du milieu pendant la croissance bactérienne.

Selon Terre (1986), *S. thermophilus* acidifie le lait plus rapidement. Et en effet ; d'après la figure n° III.2, il apparaît que le pH durant les 4 premières heures varie de 6,86 à 6,64. En se rapportant à ces résultats ; nous pouvons considérer que notre souche S17 est une bonne souche acidifiante car d'après Chamba et Prost (1989) et Chamba (1990), une souche n'est acidifiante que si la variation du pH est égale au moins à 0,5 unités en 4 heures pour *S. thermophilus*.

D'après Le travail réalisé par Boudjma (2004) le pH atteint au bout de 12 heures d'incubation est 4,33, et une autre étude sur la même espèce constate que le milieu est acidifié en obtenant un pH de 4,44 pour une durée de 8heures [47].

III.3.3 Dégradation du lactose et production de l'acide lactique:

En parallèle à la croissance de biomasse, nous avons suivi l'évolution de la production de l'acide lactique et la dégradation du lactose au cours du temps, les résultats obtenus ont été schématisés sur la figure n°III.3.

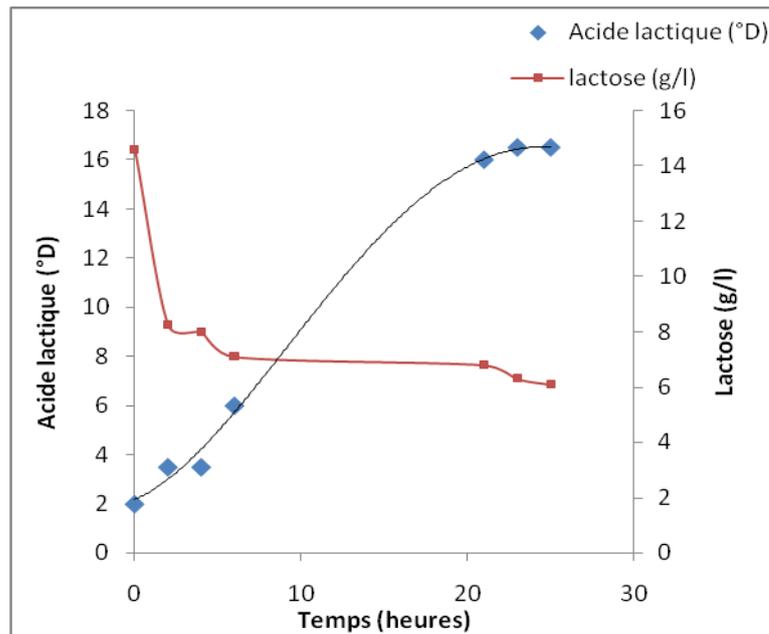


Figure n°III.3: Evolution du lactose et de l'A. lactique sur lactosérum déprotéiné.

D'après cette figure, on voit que le lactose qui était initialement à une concentration de 14,6 g/l diminue progressivement au cours du temps, et atteint à la fin de la fermentation 6,1 g/l ce qui représente un taux de dégradation de 58,22%. Cette utilisation du lactose s'accompagne d'une production remarquable d'acide lactique qui croît simultanément et passe d'une valeur initiale de 2°D à 16,5 °D au bout de 25h de fermentation ce qui représente un rendement de production égal à 87,88 %.

S. thermophilus utilise la voie d'Embden-Meyerhoff pour convertir le lactose en pyruvate, le lactose est converti en glucose et galactose par activité de la β galactosidase. Le pH a un effet sur l'activation de cet enzyme, pour un pH =4 elle a une activité faible et pour un pH voisin de 5,5 son activité est optimale [46] et [50].

Le glucose et le galactose sont convertis en pyruvate et ATP à travers la glycolyse, le pyruvate est ensuite converti en acide lactique et l'ATP sera utilisée pour la croissance et la maintenance des cellules.

Luquet et Corrieu, (2005) précisent qu'aux pH = 4,62 et 7,3, *S. thermophilus* nécessite l'ATP beaucoup plus dans la maintenance que dans la croissance et la production, ce qui explique l'inhibition à des pH bas ou élevés.

D'après Aliane (2001), le rendement de production de l'acide trouvé dans ses expériences était de 85% et la réduction du lactose est de l'ordre de 27% pour 8h d'incubation, une autre étude [58], la production d'acide lactique atteinte est de 9,06g/l au

bout de 12 heures et la diminution du lactose est de 28%, alors que dans notre cas le rendement de production de l'acide est de 66,66% et une conversion du lactose de l'ordre de 51% pour une période réduite de 6h seulement.

III.4 Influence de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne:

Les extraits de levures sont très utilisés comme source d'acides aminés et source de vitamines hydrosolubles (composition en Annexe n° 5).

Pour enrichir notre milieu et voir l'influence de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne et la production de l'acide lactique; nous avons ajouté l'extrait de levure au lactosérum déprotéiné à raison de 10 g/l. Les conditions opératoires ont été fixées de la même manière que l'expérience précédente.

Nous avons suivi l'évolution de la biomasse et du pH, ainsi que la dégradation du lactose et la production de l'acide lactique.

III.4.1 Evolution de la biomasse:

La figure III.4 permet d'observer l'évolution de la biomasse et du pH.

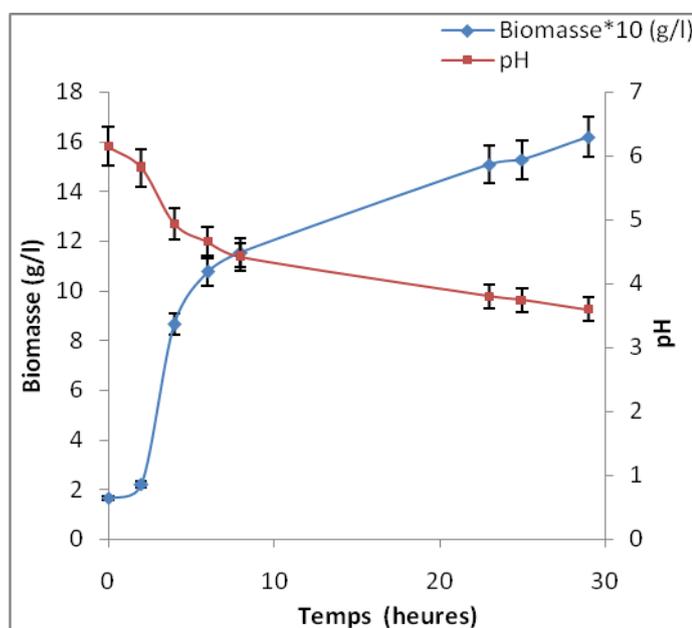


Figure n° III.4: Evolution de la biomasse et du pH sur le milieu 2.

$T = 42^{\circ}\text{C}$, $DO_{\text{inoculum}} = 2,881$

N.B: milieu 2: milieu supplémenté de l'extrait de levure ;

I: Barre d'erreur ;

On remarque que l'allure de la courbe qui représente la biomasse évolue de manière rapide et on obtient les phases de croissance suivantes:

Après la première phase d'accélération qui se traduit par un accroissement remarquable qui est dû au changement du pH et qui dure 2heures, on remarque dans la deuxième phase, une évolution qui est due au commencement de la multiplication des cellules, il est rapide vu le nombre important des cellules trouvées dans le milieu (DO inoculum =2,881).

La phase exponentielle correspond à l'intervalle de temps [2,4] h, où on observe une croissance exponentielle supérieure à la première manipulation dans la durée qui est plus lente et atteint une concentration de biomasse plus élevée.

Le taux de croissance maximal atteint sa valeur maximale μ_{\max} égale à $0,3 \text{ h}^{-1}$.

D'après Aliane [50], l'évolution conduit à une croissance de l'ordre de 89 % pour une période de 8 h, alors, qu'on a trouvé une croissance légèrement inférieure elle est voisine de 86 % pour la même durée. Tandis que l'étude réalisée sur une autre souche de *S. thermophilus* a permis d'aboutir à une croissance de 87% [58]. En effet, des résultats similaires ont été trouvés par Aeshlimani (1989), Amrane et Prigent (1997), Kulozik et Wilde (1999), Bouguettoucha et al. (2007), qui ont travaillé sur une autre bactérie lactique thermophile libre *Lactobacillus helveticus*

La phase stationnaire, a été constatée vers les 10 heures pendant la nuit.

Les points obtenus après 20 heures de culture ne sont pas exactement représentatifs car elles n'obéissent pas à la loi de Lambert- Beer.

Aliane [47] qui a travaillé sur l'optimisation des paramètres de fermentation de *S. thermophilus*, a jugé que 10 g/l est la concentration optimale de l'extrait de levure nécessaire à la croissance et la production de l'acide lactique. En revanche, Norton et al. (1994), Schepers et al. (2004), Sirisaneeyakul et al. (2007) ont travaillé respectivement sur des bactéries lactiques thermophiles immobilisées *Lactobacillus lactisIO1*, *Lactobacillus helveticus* et ont jugé que 10 g/l d'extrait de levure est la concentration optimale pour ces

deux souches afin qu'elles puissent donner une bonne croissance et production d'acide lactique.

De manière générale, l'adjonction de l'extrait de levure à notre milieu est jugé avoir un effet positif, elle modifie de manière remarquable la croissance bactérienne. Cette activité a été attribuée à la présence d'acides aminés libres, de peptides, de purines et de pyrimidines et de composées inorganiques

III.4.2 Evolution du pH au cours de la fermentation:

L'évolution du pH qui est représentée par la figure n° III.4 indique qu'il décroît rapidement de sa valeur initiale 6,15 et atteint au bout de 29 h une valeur finale de 3,6, ce qui représente un taux de 41,46 %.

Ce changement important du pH indique qu'il y a une très bonne activité microbienne ainsi qu'une grande acidification du milieu indice de production de l'acide lactique. Cette amélioration de l'activité bactérienne est dû à l'ajout de l'extrait de levure qui a permis à *S. thermophilus* un bon développement.

Il est connu qu'à des pH bas, l'acide lactique provoque une pression dans les cellules microbiennes [76], puis les bactéries perdent leurs activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de β galactosidase et d'autres enzymes de glycolyse.

Adamberg et al. (2003), ont expliqué la croissance et la production d'acide lactique à des pH bas ou alcalins par la haute résistance des bactéries lactiques aux conditions défavorables (acidité élevée, alcalinité élevée...etc.). Les bactéries lactiques thermophiles notamment *S. thermophilus*, poussent et gardent généralement leur viabilité dans des milieux de pH compris entre 4,5 et 7 [78].

D'après Aliane (2001), l'extrait de levure améliore de manière remarquable l'acidification du milieu. Et qui a trouvée un rendement d'abaissement du pH de 26 % pour une durée de 8 h et d'après Boudjema (2004) le pH du milieu baisse de l'ordre de 27,5%, au bout de 12 heures, tandis qu'on a aboutit à une acidification du milieu plus élevée elle est de 28 % pour le même intervalle de temps.

III.4.3 Influence de l'extrait de levure sur la dégradation du lactose et la production de l'acide lactique:

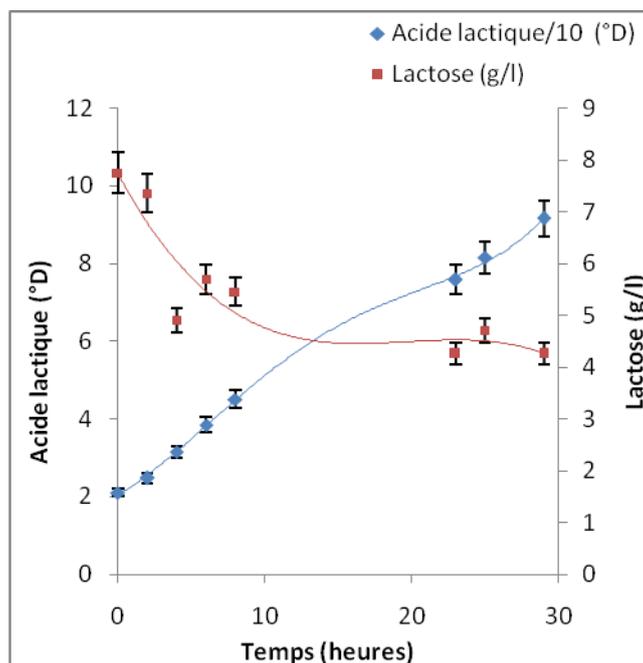


Figure n° III.5: Evolution du lactose et de l'A. lactique sur le milieu 2.

N.B: milieu 2: milieu supplémenté de l'extrait de levure

I : Barre d'erreur ;

La figure n°III.5 qui présente l'évolution de la dégradation du lactose et la production de l'acide lactique illustre la bonne cohérence entre les deux allures, le lactose décroît rapidement de sa valeur initiale de 7,75 g/l jusqu'à 12h puis se stabilise à la valeur 4,5 g/l, puis il poursuit sa dégradation légère au delà de 23h jusqu'à 29 h et atteint une valeur minimale de 4,24 g/l, ce qui représente un taux de dégradation de 45,16 %.

En parallèle à cette dégradation, l'acide lactique croît de 29°D d'une manière exponentielle et atteint une valeur maximale de 91,5 °D au bout de 29h. Le taux de croissance obtenu est de 77,05 %.

Cette valeur atteinte au bout de 29 h parait la plus élevée dans toutes les manipulations effectuées.

Mais les rendements qu'on a trouvés sont inférieurs à ceux trouvés par Aliane (2001) pour la même manipulation qui a trouvé un rendement de production de l'acide lactique de 80 % et

une réduction du lactose de 44% au bout de 8h (avec optimisation des autres paramètres), ainsi que Boudjema (2004) trouve un maximum de production de l'acide de 97,1 °D et un rendement de conversion du lactose de 37%.

Dans notre cas, le rendement de production est de 55% et la dégradation du lactose est de l'ordre de 30 % pour la même durée, cela revient aux conditions opératoires.

III.5 influence de l'adjonction du lactose sur la culture de *S. thermophilus*

Pour mieux illustrer l'effet de l'adjonction du lactose sur la croissance de *S. thermophilus* et la production de l'acide lactique, nous avons ajouté à notre milieu de culture qui contenait au départ du lactosérum déprotéiné, du lactose à raison de 10g/l, et nous avons réglé la température d'incubation à 42°C, le pH était ajusté à 7 avant la stérilisation, l'agitation étant très faible et l'aération est absente. Le milieu est inoculé de 1% de la préculture *S. thermophilus*.

Les résultats obtenus pour cette manipulation sont illustrés sur la figure III.5 qui présente l'évolution de la concentration de la biomasse et du pH, et la figure III.6 présente la production de l'acide lactique.

III.5.1 Evolution de la croissance de *S. thermophilus*:

La figure III.6 qui présente la production de l'acide lactique au cours du temps peut être interprétée comme suit :

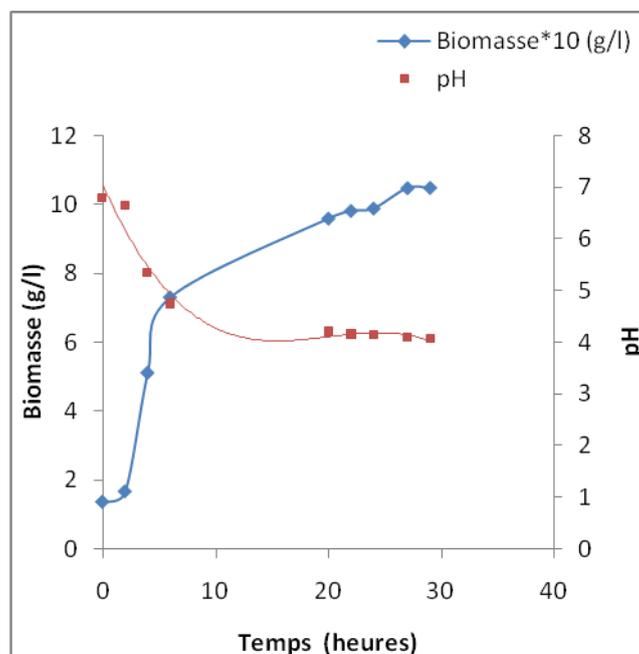


Figure III.6 : Evolution de la biomasse du pH sur le milieu 3

$T^{\circ}=42^{\circ}C$, $DO\ inoculum=2,323$.

N.B : milieu 3: lactosérum supplémenté de 10g/l de lactose.

D'après la figure n° III.6, nous observons une allure très claire et stable de la croissance bactérienne, la phase d'accélération a été observée pour la durée de [0,2] heure, on note aussi une phase exponentielle qui croît très rapidement est atteint un taux de croissance maximal de $0,26\ h^{-1}$ au bout de 4 heures. Puis, la croissance ralentit ce qui signifie que le lactose a diminué dans le milieu, après 6h de culture on obtient le plateau de la phase stationnaire où la croissance se stabilise et s'arrête (on constate qu'elle est pendant la nuit). Le nombre de cellules reste constant.

On a abouti à accroître la biomasse pendant 6h de fermentation à un rendement de 82% équivalent de 0,73 g/l, supérieur à celui obtenu par Aliane de 80% pour la même durée

d'incubation, et un autre résultat montre que la croissance bactérienne atteint 1,5 g/l pour une fermentation de 12 heures [58]. Les deux résultats précédents ont été obtenus pour une addition du lactose de 20g/l.

III.5.2 Evolution du pH:

Le pH décroît de sa valeur initiale qui était de l'ordre de 6,79 jusqu'à se qu'il se stabilise après 20 h d'incubation à une valeur limite qui est autour de 4 et atteint le plateau (figure III.6). Le rendement marqué est alors de 40,06 %, cela explique qu'il y a une très bonne activité acidifiante et bactérienne qui est due à l'enrichissement du milieu par du lactose.

D'après Aliane, après 8h d'incubation, elle a aboutit à un abaissement de pH de 26% et selon Boudjema (2004), le pH chute de l'ordre de 33% pour une fermentation de 12 heures, par contre on a pu acidifier le milieu jusqu'à 30% au bout de 6h seulement.

III.5.3 Production de l'acide lactique sur culture supplémentée de lactose:

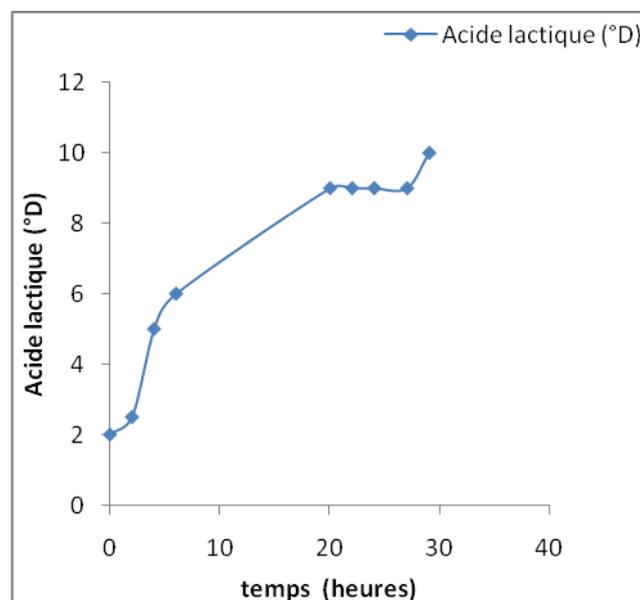


Figure III.7: Evolution de la production de l'A. Lactique sur le milieu 3

N.B : milieu 3: lactosérum supplémenté de 10g/l de lactose

La production d'acide lactique représenté sur la figure III.7 indique qu'il y a une croissance très stable qui progresse de la valeur initiale de 2°D et se stabilise à la valeur de 9°D après 20 h de croissance, cette stabilité dure 7h pendant ce temps la croissance bactérienne est à sa phase de ralentissement et le pH est stable à la valeur 4. Cela signifie que le milieu commence à s'appauvrir en nutriments. Après cette stabilité de production de l'acide lactique on remarque une légère croissance de 9°D à 10°D. Le rendement de production de l'acide lactique atteint à cette manipulation une valeur de 80 %.

D'après Bertheau et Al. (1985), le β -galactosidase est induite par l'adjonction de lactose au milieu de culture. Ce qui facilite la consommation rapide de substrat et provoque ainsi une bonne croissance.

A titre comparatif, après 6h de culture ; on a atteint une production de 67% valeur légèrement inférieure que celle trouvée par Aliane qui a atteint 75% pour la même durée. Ainsi, la même manipulation réalisée sur une autre souche de *S. thermophilus* illustre que le rendement de production de l'acide est de 78% de même la dégradation du lactose 32% [58].

III.6 Analyse de la dégradation du lactose par mesure de la DCO sur les trois cultures :

Après avoir suivi l'évolution de la dégradation du lactose par la méthode chimique de dosage de Bertrand, Nous allons la suivre par la demande chimique en oxygène DCO. La manipulation a été réalisée pour les trois échantillons: au début, au milieu et la fin de la fermentation dont le but de poursuivre l'évolution.

On rappelle que la DCO (Demande Chimique en Oxygène) exprime la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique biodégradable ou non d'une eau à l'aide d'un oxydant fort, le bichromate de potassium sous des conditions données.

La DCO peut être réalisée plus rapidement que la DBO et donne une idée de la matière organique totale présente, même quand le développement de micro-organismes est impossible (présence d'un toxique par exemple). Le résultat s'exprime en mg/l d'O₂, alors que la DBO₅ qui exprime le taux de dégradation par exemple ne mesure que la matière organique naturellement biodégradable. C'est pourquoi les valeurs de DCO sont nécessairement supérieures aux valeurs de DBO₅.

Les résultats obtenus dans notre cas ont permis de tracer l'évolution de la DCO en fonction du temps. L'histogramme de la figure III.7 illustre l'évolution de la DCO sur les

cultures de lactosérum déprotéiné, lactosérum supplémenté de l'extrait de levure et le lactosérum supplémenté de lactose.

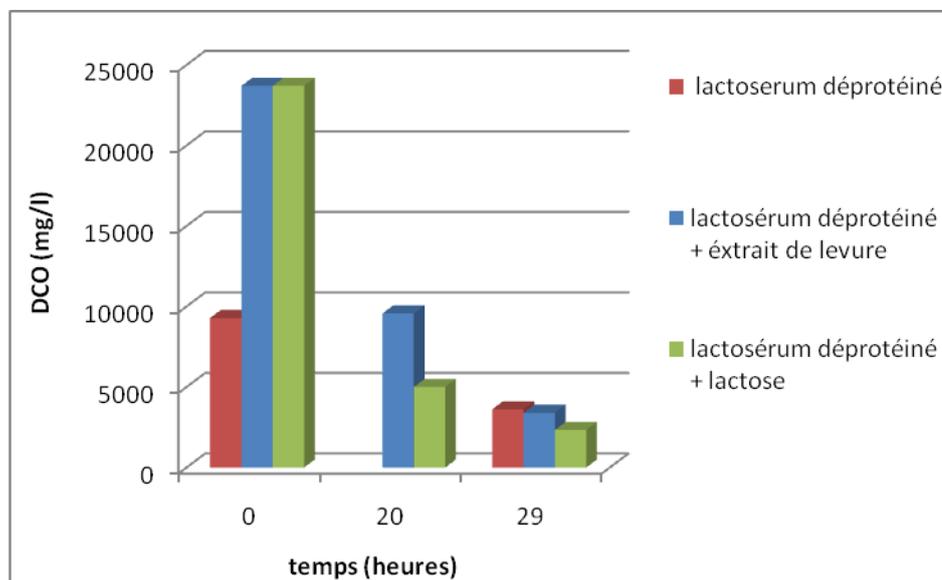


Figure n° III.8: Evolution de la DCO au cours du temps sur le lactosérum.

Dans la culture de lactosérum non supplémenté, la dégradation du lactose entraîne une baisse de la DCO, qui avait initialement une valeur 9283,33 mg/l, jusqu'à une valeur de 3615 mg/l au bout de 29 h, ce qui correspond à un abattement voisin de 61 %. La quantité d'oxygène perdue a été utilisée pour oxyder une quantité du lactose qui est présent dans le milieu et qui est éliminé de 5668,33 mg/l.

Tandis que pour la culture à base de lactosérum déprotéiné supplémenté de l'extrait de levure à titre de 10 g/l avec inoculation de 1% de préculture de *S. thermophilus*.

L'évolution de la dégradation de la DCO au cours du temps, on bien observé une diminution remarquable de la DCO, c'est la disparition du lactose qui a conduit à une chute importante de la DCO d'une valeur initiale égale à 23700 mg/l à une valeur finale de 3999,99 mg/l. Soit une réduction de près de 85,65 % en un temps de 29 heures.

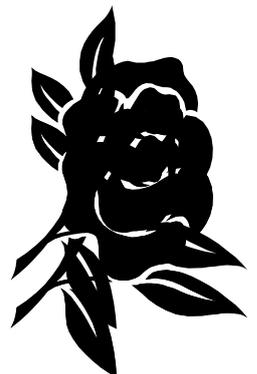
On constate donc; que l'ajout de l'extrait de levure a amélioré l'activité et le développement de *S. thermophilus* qui a accéléré son rendement de dégradation du lactose et elle a utilisé près

de 19700 mg/l pour éliminer la majorité du lactose présent dans le milieu soit 45,16 % et le convertir en acide lactique.

Dans la troisième culture où nous avons ajouté 10 g/l de lactose et le milieu contenait de 7,75 à 14,6 g/l cela veut dire que le milieu contient près de 20 g/l de matière organique. Notre espèce *S. thermophilus* a trouvé suffisamment de substrat pour se développer et consomme alors le lactose présent, la DCO diminue de façon importante et elle chute de 23700 mg/l à 2333,33 mg/l ce qui traduit un rendement de 90,12 % de diminution au bout seulement 29 h.

Ce rendement paraît le meilleur trouvé au cours des trois manipulations effectuées, car pour le milieu à base de lactosérum déprotéiné non supplémenté on a abouti à un rendement de 61 % de la DCO et pour la culture sur milieu supplémenté de 10 g/l on a pu améliorer le rendement jusqu'à 85,65 % d'élimination de matière organique. Alors ; on peut dire que plus le milieu est enrichi de matière organique, plus *S. thermophilus* est active, elle trouve le substrat nécessaire à son développement et cultive mieux en utilisant l'oxygène présent dans le milieu pour dégrader le lactose qui se trouve à la fin de fermentation à des concentrations limitantes.

CONCLUSION



Conclusion :

La pollution est un phénomène qui nuit à la vie de toute être vivant : homme, animal et nature ; elle est dangereuse parce qu'elle répand des matières toxiques dans l'air, l'eau et le sol.

Les entreprises agro-alimentaires génèrent une pollution sérieuse de l'environnement par les rejets de déchets et des effluents non traités. L'industrie fromagère compte parmi ces pollueurs, elle est à l'origine de la pollution des cours d'eau par le rejet de quantités considérables de lactosérum.

Le traitement biologique est l'un des moyens les plus efficaces qui peuvent réduire de manière importante cette charge polluante en utilisant des microorganismes capables de métaboliser la matière organique présente dans le lactosérum et de la convertir en un sous-produit utile. C'est aussi une alternative intéressante aux traitements physico-chimiques pas souvent efficaces.

L'étude que nous avons réalisée dans cette thèse a pour but de proposer une méthode de valorisation du lactosérum par production d'acide lactique par les bactéries lactiques, dans notre cas l'espèce utilisée est *Streptococcus thermophilus*. L'étude est basée sur plusieurs paramètres: la consommation du lactose, la production de l'acide lactique, la mesure de la croissance bactérienne, l'abaissement du pH, la mesure de la demande chimique en oxygène DCO. De plus, l'influence de certains paramètres de culture (extrait de levure et lactose) a été étudiée.

Nous avons trouvé que la fermentation entraîne une augmentation de la croissance bactérienne à 1,94 g/l avec un rendement de production de 90,9 % pendant 6 heures et de la production de l'acide lactique jusqu'à 16,5 °D équivalent de 87,88 %, une baisse de la concentration résiduelle en lactose avec un abattement de 58,22 %, du pH du milieu qui peut baissé jusqu'à 5,32 ainsi que de la DCO avec un abaissement de 61% et cela pour une durée de 29 heures.

L'effet de l'extrait de levure a été bien observé par une amélioration considérable de la croissance bactérienne qui a augmenté jusqu'à la valeur de 1,155 g/l pendant 8h, associée à une croissance exponentielle de la production de l'acide lactique avec une valeur limite de 91,5 °D. Les résultats montrent aussi que le milieu est très acidifié à la fin de la fermentation un pH de 3,6 est atteint en 29 heures de fermentation. Le lactose de ce fait est abaissé pour donner une valeur minimale de 4,24 g/l. A cela s'ajoute une réduction de la DCO de 90,12% traduisant un effet dépolluant de la fermentation du lactosérum par la bactérie lactique.

L'enrichissement du lactosérum en tant que milieu de culture par le lactose a montré un accroissement de la production de l'acide lactique et de la biomasse parallèlement à un abaissement du pH et de la teneur en lactose.

La réduction importante de la DCO suite à dégradation du lactose du lactosérum traduit le phénomène de dépollution assurant une réduction de la charge polluante organique.

Enfin, il serait intéressant de faire une optimisation des paramètres physico-chimiques (T°, pH) et des paramètres du milieu de culture (extrait de levure, lactose) dans le but de travailler dans les meilleures conditions de fermentation, comme il est intéressant de faire une symbiose de deux bactéries lactiques par exemple *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* afin d'accélérer et d'améliorer la croissance bactérienne et la production de l'acide.

Bien que ce traitement soit réalisable à l'échelle de laboratoire, il serait intéressant de faire une étude technico économique, afin d'envisager une production de l'acide lactique par ce procédé à grande échelle.

ANNEXE



Annexe N°1: Réactifs

* Déprotéinisation du lactosérum :

- Solution concentré d'acide sulfurique.

* Dosage du lactose:

Solution aqueuse d'exocyanure de potassium $K_4 Fe[CN]_6, 3H_2O$: 150 g/l

Solution aqueuse d'acétate de zinc $Zn[CH_3COO]_2, 2H_2O$: 300 g/l

- Solution cuivrique : elle est préparée comme suit :

- * Sulfate de cuivre II $Cu SO_4, 5 H_2O$: 40g

- * acide sulfurique $\rho_{20} = 1.83$ g/ ml : 2 ml

- * eau distillée: 1l

- Solution tertro-alkaline : qu'on prépare comme suit :

- * tartrate de sodium et de potassium $Na K [H_4 C_4 O_6], 4 H_2O$: 200 g

- * hydroxyde de sodium, NaOH: 150 g

- * eau distillée : 1l

- Solution ferrique : qu'on prépare comme suit :

- * sulfate de fer III: $Fe_2 [SO_4]_3$: 50 g

- * acide sulfurique $\rho_{20} = 1.83$ g/ ml : 200 g

- * eau distillée q.s.p : 1l

Avant emploi, on oxyde exactement s'il y a lieu, par addition d'une solution de permanganate de potassium 0.1 N, la petite quantité de sel ferreux éventuellement présente dans cette solution de sel ferrique.

Solution titrée de permanganate de potassium 0.1 N : 1 ml de cette solution correspond à 6.35 mg de cuivre.

Solution d'orthophénantroline ferreuse : préparée comme suit :

- * Sulfate de fer II $Fe SO_4, 7 H_2O$: 0.695 g

- * Orthophénantroline: 1.485 g

- * Eau distillée q. s. p : 1l

*** Dosage de l'acide lactique :**

- Solution de phénophtaléine (1% dans l'éthanol à 95%).
- Solution titrée d'hydroxyde de sodium 0.111 N (N/9) dont 1 ml correspond à 0.01 g d'acide lactique. Cette solution est appelée soude Dornic.

Remarque:

- La solution d'hydroxyde de sodium peut être préparée en diluant à 1000 ml, 111 ml d'hydroxyde de sodium N.

Le dosage peut être aussi effectué au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium 0.1 N.

*** Mesure de la DCO :**

*** Solution de digestion:** pour préparer 1 litre de solution il faut:

Dissoudre 10.216g de $K_2Cr_2O_7$, préalablement chauffé à 105°C pendant 2h, dans 500 ml d'eau distillée.

Ajouter doucement 167ml de H_2SO_4 concentré et 33.3 g de $HgSO_4$, dissoudre à température ambiante et diluer à 1000ml avec de l'eau distillée.

*** Réactif d'acide sulfurique:**

Dans une bouteille contenant 1 Kg de H_2SO_4 , ajouter 5.5 g d' Ag_2SO_4 . Laisser reposer 1 à 2 jours afin que l' Ag_2SO_4 soit complètement dissous. La solution doit être conservée à l'obscurité

*rg ed noitarolocam:

- Violet de Gentiane.
- Solution iodo-iodurée de Lugol.
- Solution de violet de gentiane
- Solution d'alcool 100°.
- Solution de la fuchsine.

Annexe N°2: Matériels

- Autoclave de marque CERTOCLAV
- Etuve de marque MEMMERT
- Spectrophotomètre UV/visible de marque SHIMADZU
- Erlenmeyer de 2 litre
- pH-mètre de marque HANNA
- Agitateur vortex de marque FISHER bioblock scientific
- Bloc chauffant à une température de 150°C de marque BIOBLOCK
- Centrifugeuse de marque HATTICK
- Plaque chauffante munie d'un agitateur de marque STUART
- dispositif de filtration garni d'amiante ou d'une plaque de verre fritté de porosité appropriée (5 à 15 μm)
- Bec bunsen
- balance analytique
- lamelles
- microscope optique
- Verrerie courante de laboratoire

Annexe N°3: tableau A

"Dosage du lactose (technique de G. Bertrand)"

Tableau donnant la quantité de lactose hydraté exprimée en grammes en fonction du volume de permanganate de potassium 0.1 N versé.

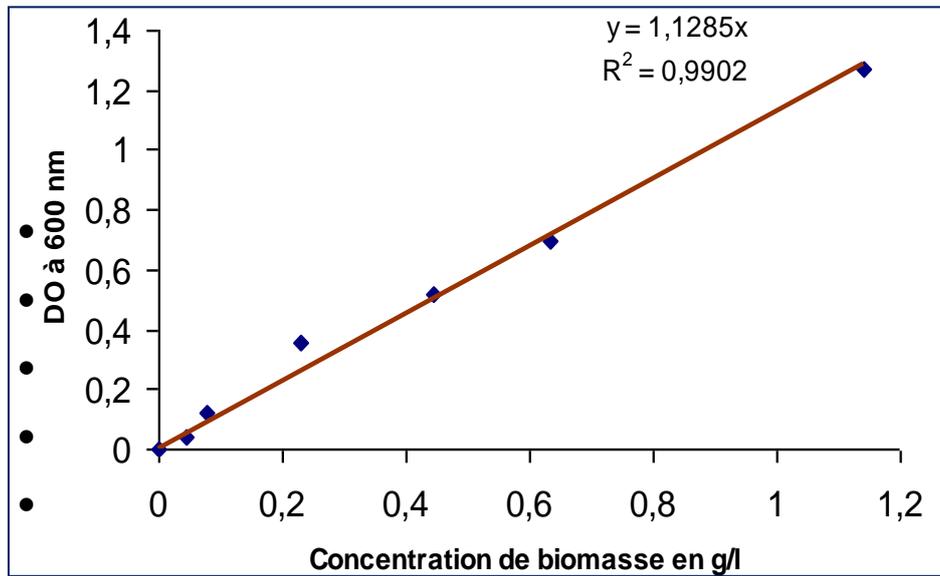
Colonnes 1 : ml de solution de permanganate de potassium 0.1 N versés ;

Colonnes 2 : lactose hydraté en gramme par litre de lait.

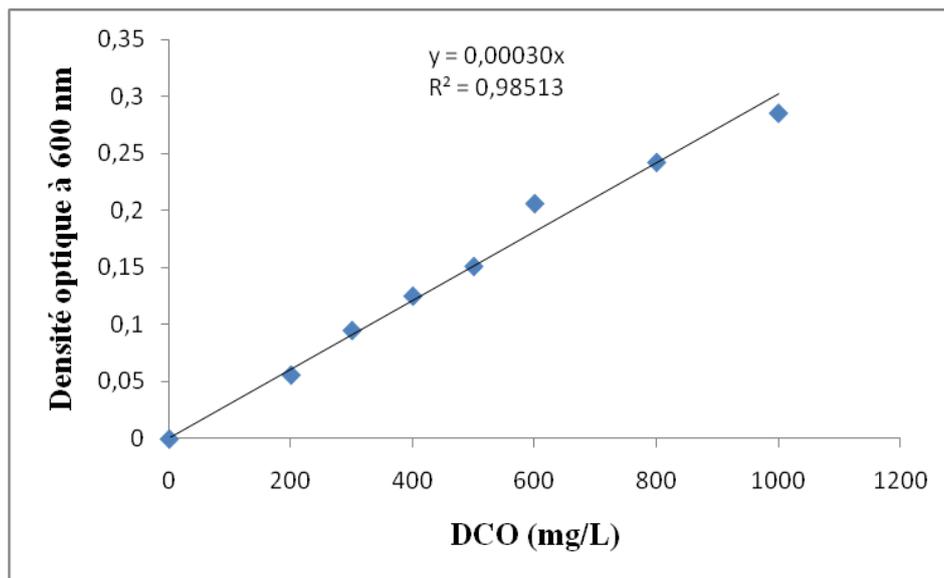
1	2	1	2	1	2
5,0	23,6	8,4	40,5	11,8	57,9
5,1	24,1	8,5	41,0	11,9	58,4
5,2	24,6	8,6	41,5	12,0	58,9
5,3	25,1	8,7	42,0	12,1	59,5
5,4	25,6	8,8	42,5	12,2	60,0
5,5	26,1	8,9	43,0	12,3	60,5
5,6	26,6	9,0	43,5	12,4	61,0
5,7	27,1	9,1	44,0	12,5	61,5
5,8	27,6	9,2	44,5	12,6	62,1
5,9	28,0	9,3	45,0	12,7	62,6
6,0	28,5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

Annexe N° 4

- La courbe d'étalonnage de la biomasse : *Streptococcus thermophilus*



- La courbe d'étalonnage de la DCO :



*** Composition de l'extrait de levure (Ghaly et al ,2003) :**

Composition	%
- Humidité	30
- Azote total	8.8
- Protéine	55
- Solubilité (mg/l) à 30°C	3000-1000
Acides aminés	% de totale
- Alanine	3.4
- Acide aminobutyrique	0.1
- Arginine	2.1
- Asparagine	3.8
- Cystine	0.3
- Acide glutamique	7.2
- Glycine	1.6
- Histidine	0.9
- Isoleucine	2.0
- Leucine	2.9
- Lysine	3.2
- Methionine	0.5
- Orthonine	0.3
- Phenylalanine	1.6
- Praline	1.6
- Serine	1.9
- Threonine	1.9
- Tyrosine	0.8
- Valine	2.3
Sels minéraux	%
- NaCl	<1
- Cuivre	---
- Fer	---
- Magnésium	---
- Potassium	---
- Sodium	---
Vitamines	ppm
- Thiamine	20-30
- Riboflavine	50-70
- Pyridoxine	25-35
- Niacinamide	600
- Acide pantothenique	200

***Composition de milieu M17:**

Composition de milieu M₁₇ en g/l :

- Tryptone.....	2.5
- Tryptone pepsique.....	2.5
- Extrait de levure.....	5
- Extrait autolytique de levure.....	2.5
- Peptone papoinique.....	5
- Lactose.....	5
- Glycerphosphate de sodium.....	19
- Sulfate de magnisium.....	0.25
- Acide ascorbique.....	0.5
- Eau distillée.....	1000 ml
- pH.....	7.7

Autoclaver à 120°C pendant 20min

exenna N° 6

***résultats de la manipulation 1- lactosérum déprotéiné :**

temps (heures)	Biomasse (g/l)	Acide lactique (°D)	Lactose (g/l)	pH
0	0,177	6,86	2	14,6
2	0,408	6,64	3,5	8,26
4	1,76	6,64	3,5	8
6	1,94	6,04	6	7,1
21	2,96	5,96	16	6,8
23	3,146	5,54	16,5	6,3
25	3,225	5,32	16,5	6,1

***résultats de la manipulation 2 – lactosérum supplémenté de l'extrait de levure :**

temps (heures)	Biomasse (g/l)	Acide lactique (°D)	Lactose (g/l)	pH
0	0,1657	21	7,75	6,15
2	0,221	24,75	7,35	5,81
4	0,864	31,5	4,9	4,94
6	1,0757	38,5	5,7	4,66
8	1,155	45	5,45	4,42
23	1,5068	75,75	4,25	3,8
25	1,5267	81,5	4,7	3,74
29	1,6175	91,5	4,25	3,6

***résultats de la manipulation 3 – lactosérum supplémenté de lactose :**

Temps (heures)	Biomasse (g/l)	Acide lactique (°D)	pH
0	0,1355	2	6,79
2	0,1657	2,5	6,65
4	0,5104	5	5,35
6	0,7301	6	4,74
20	0,9588	9	4,2
22	0,981	9	4,15
24	0,988	9	4,14
27	1,0472	9	4,09
29	1,048	10	4,07

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- [1] **Kiger et Kiger, 1985.** Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie, boulangerie industrielles et artisanales et des produits de régime. Revue française.
- [2] **Kosikowsky L., 1979.** Utilisation du lactosérum et produits à base de lactosérum. Science et technique, revue laitière française: 972, 11-97.
- [3] **Fabrication de saint-paulin :** capture par memo web consulté **Avril 2009 :**
www.ac-nancy-metz.fr/enseign/svt/eleve/prodelev/Ensaia/stpaul.html
- [4] **Sottiez L., 1985.** Produits dérivés des fabrications fromagères. Lait et produits laitiers, tome II. Apria.
- [5] **FAO / OMS, 1977.** Comité d'experts sur le code de principe concernant le lait et les produits laitiers, 7^{ème} édition.
- [6] **Corbiere, A., 1978.** Possibilités d'utilisation des lactosérums de fromagerie. RIA : 260, 35-45.
- [7] **Vrignaud V., 1979.** Le lactosérum, une matière première noble pour les industries alimentaires humaines et animales. Revue laitière française: 372, 27-39.
- [8] **Alais C., Mars 1981.** La valorisation du lactosérum: les bases et les problèmes. *La technique laitière* N° 952, pp 7 – 10.
- [9] **Veisseyre R., 1975.** Technologie du lait. *La maison rustique*. Paris.
- [10] **Adrian J., 1973.** Valeur alimentaire du lait. *La maison rustique*. Paris.
- [11] **Boudier J. F. & Luquet F. M., 1980.** Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. *Apria*. N° 21.136p.
- [12] **Lactosérum.** Capture par memo web à partir de :
http://fr.wikipedia.org/wiki/eaux_blanches_de_laiterie
- [13] Le traitement des effluents en Fromagerie, **Janvier 2000.** Article publié dans L'égide n° 18.
- [14] **Westergaard, 1978 cité par Sottiez L., 1985.** Produits dérivés des fabrications fromagères. Lait et produits laitiers, tome II. *Apria*.
- [15] **Beauchamp J., 2003.** D.E.S.S. Qualité et Gestion de l'Eau. La pollution littorale. Université de Picardie Jules Verne : Jacques.beauchamp-picardie.fr
- [16] **Education à l'environnement, 2009.** Pollution de l'eau, **webmestere:**
www.polution_de_l'eau

- [17] **Casalis J., Juin 1975.** Considération sur l'utilisation du lactosérum dans l'industrie alimentaire. Revue laitière française N° 332.
- [18] **Cheftel et Lorient, 1982.** Introduction à la technologie des aliments. Vol. 2- Edition technique et documentation – Lavoisier. Paris.
- [19] **Sadouki, 1978.** Traitement thermique du lactosérum- répercutions sur la qualité bactériologique et nutritive. Thèse ingénieur agronome. E.N.S.A. El-Harrach
- [20] **Devo P., Février 1975.** A propos des utilisations du lactosérum. Revue laitière française N° 338.pp 131-134
- [21] **Girard P. et Morel Darrieux F., Mars 1982.** Lactosérum acide pour vaches laitières. Revue cultivar.
- [22] **Apria, Novembre 1973.** Les lactosérums, traitements et utilisations, 262p.
- [23] **Mann E., 1986.** Utilisation du lactosérum traduit par G. Odet, revue française laitière n° 448.
- [24] **De la gueriviere J.F., 1978.** Intérêt d'emploi d'un type de lactosérum doux en panification fine et en biscuiterie sèche. Revue alimentaire n° 65.
- [25] **Pinel M., 1981.** Utilisation du lactosérum dans la l'alimentation humaine traditionnelle. Produits de charcuterie, de salaison et conserves de viande. *La technique laitière* n° 959. (Numéro spécial: valorisation du lactosérum).
- [26] **Scott R., 1981.** Cheesemaking Practic, Applied Science Publishers Ltd. London.
- [27] **Coton S.G., 1985.** Whay Resources and utilization. *Journal of the society of dairy technology*. Vol 38, n°4.
- [28] **Zadow J.G., 1987.** Utilisation des constituants du lait. Revue laitière française. *Apria*
- [29] **IAN.O.R, Avril 2009.** Communication personnelle.
- [30] Acide lactique. Capture par memo web à partir de :
http://fr.wikipedia.org/wiki/acide_lactique
- [31] Travail de synthèse de Wehrmüller K., Agroscope Liebefeld. Posieux. Station fédérale de recherches en production animale et laitière.
- [32] www.caducee.net
- [33] Centre de Ressources Technologiques pour les Entreprises Agro-alimentaires.
www.adrianor.com
- [34] **Baharak A., Décembre 1999.** Effet de la température sur la croissance bactérienne et la production de composés d'aromes dans du lait supplémenté de citrate par des bactéries lactiques mésophiles aromatisantes en culture mixte. Thèse de doctoral. Université de Moncton.

- [35] **Cholet O., Décembre 2006**, Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse de doctoral. Paris. Grignon.
- [36] **Saloffe Coste C. J., July 1994**. Lactic acid bacteria. *DANONE*. News letter n°5.
- [37] **Stiles M. E. & Holzapfel W. H., 1997**. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1-39.
- [38] **Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curck M.C.et Janssens D., 1994**. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : les bactéries lactiques. T1. Ed Loriga, Lavoisier. Paris, 604 p.
- [39] **Olivier G., Novembre 2007**. Streptocoques & entérocoques. Faculté de Médecine. Rennes.
- [40] **Leveau J. Y., Bouix M., 1993**. Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier. *Apria*. Pages: 171-309.
- [41] **Larpent J. P., Larpent M., Gourgaud**. Mémento technique de microbiologie. La cellule bactérienne. Métabolisme systématique. Bactéries utiles. Milieux de culture et réactifs. Pages : 92-98
- [42] **Shahbal S., Hemme D. & Desmazeaud M., January 1991**. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk I.N.R.A. Station de Recherches Laitières. France.
- [43] **Hemme D. et Michèle N., 1980**. électrophorogrammes des protéines, de la Bêta-galactosidase et de l'aldolase de *Streptococcus thermophilus et des lactobacilles thermophiles*. Leurs variations selon les souches et les conditions de culture.
- [44] **Tsai S. P., Coleman R. D., Moon S. H., Schneider, K. A., & Sanville M. C., 1993**. Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Aml. Biochem. Biotechnol.*, 323-335.
- [45] **Lauro F., Avril 2009**. TSTL Cours de biochimie. La glycolyse:
[www.lpasteur.org/IMG/pdf/ TSTL.Bioch.Cours_.Chap.4.Metabolisme.III.La.glycolyse.pdf](http://www.lpasteur.org/IMG/pdf/TSTL.Bioch.Cours_.Chap.4.Metabolisme.III.La.glycolyse.pdf)
- [46] **Desmazeaud M. 1983**. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Mécanisme de dégradation du lactose en acide lactique par les bactéries lactiques. *Dairy Science and Technologie. Le lait*.
- [47] **Aliane N., 2002**. Optimisation des paramètres de fermentation pour la production de l'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum : établissement d'un model mathématique. Thèse de magister. ENSA. El-Harrach.
- [48] <http://tpe.bacteriewww.maison-du-lait.com/Publicat/Questions sur/pdf/QS 30.pdf>

[49] **Cherif M., Elbarji A., Nguyen M., TS4 2004-2005.** TPE La croissance des bactéries par capture de la page mémo : <http://tpe.bacterie.free.fr/grand%202.htm>

[50] **Scriban R., 1999.** Biotechnologie. 5^{ème} édition *Tech & doc*. Lavoisier. Parie. Pages: 193-210.

[51] **Croissance bactérienne, Avril 2009 :** capture par memo web: mon.ftp.a.moi.chezalice.fr/Ecole/DEUG_SV1/BioCell/MicroBi1.pdf

[52] **Moulin G., Galzy P., Ratomahemina R., 1976.** Sélection des levures en vue de la culture sur lactosérum. *Lait*, 553-554.

[53] **A.F.N.O.R ,1986.** Méthodes d'analyses du lait et des produits laitiers. Recueil de Normalisation Française. 2^{ème} édition, 580 p.

[54] **Serres L., Amariglos et Petransxiene D., 1974.** Contrôle de la qualité des produits laitiers. Direction des services vétérinaires. Ministère de l'agriculture. France.

[55] **Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec,** Détermination de la demande chimique en oxygène dans les effluents : méthode de reflux en système fermé suivi d'un dosage par colorimétrie avec le bichromate de potassium. MA.315-DOC 1.0. Ministère de l'environnement du Québec, 14 p.

[56] **Chamba J.F. et Prost F., 1989.** Mesure de l'activité acidifiante des bactéries thermophiles pour la fabrication des fromages à pates cuites. *Lait* 69, 417- 41-31.

[57] **Chamba J.F., 1990.** Pas de piston pour les thermophiles. *Revue laitière française*, 492, 47-50.

[58] **Boudjema K., 2004.** Optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Thèse de magister. Université de Boumerdes.

[59] **Tango M. S. A. and Ghaly A. E., 1999.** Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using lactobacillus helveticus under batch conditions. *Biomass and bioenergy*, 16:61-78.

[60] **Accolas J.P., Bloquel R., Diedienne R., Regnerj., 1977.** Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yaourt. *Lait*, 67:1-23.

[61] **Radke M. C. and Sandine W. E., 1986.** Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *lactobacillus bulgaricus*. *Journal of dairy sicence*, 69: 2558-2568.

- [62] **Bensiameur K., 1996.** Lyophilisation de *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*, détermination des conditions optimales .Thèse de magistère, E.N.S.A, El Harrach, 126p.
- [63] **Boubechiche Z., 1999.** Optimisation des paramètres de fermentation de *Streptococcus thermophilus*: étude de l'activité acidifiante et l'activité aromatique. Thèse de magistère, E.N.S.A, El - Harrach, 68p.
- [64] **Robinson R. K., 1988.** Cultures for yoghurt - their selection and use. *Journal dairy industry*, 53:15-17.
- [65] **Bourgeois C. M. et Larpent J.P., 1996.** Microbiologie alimentaire T2 ; aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed Technique et documentation, 523p.
- [66] **Gyosheva B.,Petrova L. and Mutafchieva M., 1995.** Preservation of *Streptococcus thermophilus* strains after long term storage in lyophilized state. *Journal of culture collections*, 1:34-37.
- [67] **Terre S., 1986.** Propriétés technologiques, nutritionnelles et physiologiques de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. *Technique laitière et marketing*, 1008 :26-36.
- [68] **Luquet M. et Corrieu G., 2005.** Bactéries lactiques et probiotiques, *Lavoisier*, Paris, 307p.
- [69] **Aeschlimani A., 1989.** Productions of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. Thèse de doctoral. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, 165p.
- [70] **Amrane A. and Prigent Y., 1997.** Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: influence of peptidic nitrogen deficiency. *Journal of biotechnology*, 55:1-8.
- [71] **Kulozik N. and Wilde J., 1999.** Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and microbial technology*, 24: 297-302.
- [72] **Bougettoucha A., Balannec B., Nacef S and Amrane A., 2007.**A generalized unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*.*Enzyme and microbial technology*, 41:377-382.
- [73] **Norton S., Lacroix C and Vuilleumard J.C., 1994.** Reduction of yeast extracts supplementation in lactic acid fermentation of whey permeate by immobilized cell technology.*Journal of Dairy Science*, 77:2494-2508.

- [74] **Schepers A.W., Thibault J. and Lacroix C., 2004.** Continuous lactic acid productions in whey permeate /yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two stage process: model and experiments.
- [75] **Sirisaneeyakul S., Luangpipat T., Vanichsriratana W., Srinophakun T., Chen H.H and Chisti Y., 2007.** Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO1. *Journal of industry microbiology and biotechnology*, 34:381-391.
- [76] **Vali M., Sauer M., Branduarddi P., Borth N., Porro D and Mattanovich D., 2006.** Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisia* by cell sorting for height intracellular pH. *Applied and environmental microbiology*, 5492-5499
- [77] **Adamberg Y.K., Kask S., Laht T.M and Paalme T., 2003.** The effect of temperature and pH on the growth of lactic bacteria: a pH- auxostat study. *International journal of food and microbiology*, 85:171-183.
- [78] **Hutkins R.W. and Nannen N. L., 1993.** pH homostasis in lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*, 76:2354-2365.
- [79] **Bertheau Y., Kotoyanhy A. et Colino A., 1985.** Sources actuelles et potentielles d'enzymes d'hydrolyse et de polymérisation *in* : Hydrolyses et depolymérasés.

Résumé :

L'objectif de ce travail est de produire de l'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* S17, afin de valoriser un sous produit issu des fabrications fromagères 'le lactosérum'. La fermentation a été réalisée en discontinu, à pH libre et à une température de 42°C. nous avons trouvés une biomasse de 1,94 g/l au bout de 6h avec une production de l'acide de 16,5 °D en 25h. L'influence de certains paramètres de culture : effets de l'extrait de levure et le lactose sur cette production a été étudiée et on a obtenus une production de l'acide de 91,5 °D en 29h à la culture supplémenté de l'extraire de levure et l'abatement de la DCO atteint 90,12% en culture supplémentée du lactose.

Mos clés : Valorisation, lactosérum, *S. thermophilus* S17, acide lactique.

Abstract :

The objective of this work is to produce lactic acid by *Streptococcus thermophilus* S17, in order to develop under product resulting from cheese-making manufacture' the whey'. Fermentation is made into discontinuous, with free pH and with a temperature of 42°C. Then the study made it possible to see the influence of certain parameters of culture: effects of the yeast extract and lactose on this production.

Key - worlds : Valorisation, whey, *S. thermophilus* S17, lactic acid.

ملخص :

ان الغرض من هذا العمل هو انتاج حمض اللبن باستعمال سترپتوكوكوس ثرموفيلوس س 17 بهدف استغلال المصل الحليبي الناتج عن صناعة الجبن. لقد درسنا عملية التخمر في ظروف غير مستمرة ذات حامض هيدروجيني الغير مراقب ومع درجة حرارة 42 °م. ثم درسنا تاثير اضافة الخميرة و الاكتوز الي التخمر.

كلمات المفاتيح : استغلال, المصل الحليبي, سترپتوكوكوس ثرموفيلوس س 17, حمض اللبن.