



**Ecole Nationale Polytechnique**  
**Département du Génie de l'Environnement**

**Mémoire de projet de fin d'études**

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

**Thème :**

**Evaluation de la pollution issue de l'industrie  
laitière et valorisation du lactosérum**

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> GACI Sakoura**

**Soutenue le 26/06/2011 devant le Jury composé de :**

<b>Président :</b>	<b>M<sup>r</sup> A. NAMANE</b>	<b>Maître de conférences, ENP</b>
<b>Directrice d thèse :</b>	<b>M<sup>me</sup> A.HELLAL</b>	<b>Professeur, ENP</b>
<b>Examinatrices:</b>	<b>M<sup>elle</sup> O. ALI</b>	<b>Maître assistante B, UMMTO</b>
	<b>M<sup>me</sup> W. BENHEDDI</b>	<b>Maître assistante A, ENSA</b>

---

**Année universitaire 2010/2011**

**ENP, 10 Avenue Hacén Badi El-Harrach**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail pour toutes les personnes qui ont été à mes cotés dans toutes les situations et sans lesquelles ce travail ne serait pas terminé à temps.*

*Je commence par mes très chers parents \*\*Mama et Kacem\*\* qui représentent absolument tout pour moi, que j'espère rendre fiers "Que Dieu les garde pour moi";*

*Ma très chère grande sœur Dilia qui, malgré son absence, m'a soutenue et encouragée ;*

*Mon petit frère et ma petite soeur adorés Yacine et Seyna ;*

*Mes très très chères "Aisha et Hadjer" que j'ai eu la chance de connaître qui sont comme des sœurs pour moi ;*

*Ma fabuleuse Djidji et l'adorable Hanane ;*

*A mes tantes, oncles, cousins et cousines plus particulièrement Malika, Nabila .*

*Et puisque je ne peux pas citer tout le monde, je dédie ce travail à toutes les personnes que j'ai connues et avec lesquelles j'ai passé des moments que je n'oublierai jamais.*

*Sekoura*

## *Remerciements*

*Avant tout développement, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de ce mémoire.*

*Tout d'abord, Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **M<sup>me</sup> Hellal.A** (professeur à l'ENP), pour sa disponibilité, sa confiance, le temps qu'elle m'a accordé et surtout d'avoir accepté de diriger ce travail qui est un grand honneur et une énorme chance pour moi ;*

*Je remercie aussi **Mr Nâmane.A** (maître de conférences à l'ENP) de m'avoir fait l'honneur de bien vouloir présider le jury;*

*Aussi, je tiens à remercier **m<sup>elle</sup> Oumesaâd** (maître assistante à l'UMTO) ainsi que **M<sup>me</sup> Benfeddi. W** (maîtres assistantes à l'ENSI) pour leur précieux conseils, soutien mais aussi pour avoir accepté d'examiner mon travail ;*

*Je remercie **M<sup>me</sup> Z. LAMALI** (Chef Service Analyse Chimique) pour avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire de la société des eaux et d'assainissement de Kouba (SEAA), et Un Grand Merci à l'ensemble des employés du Laboratoire Central pour m'avoir reçue chaleureusement et accordée leur temps ;*

*Je remercie **Latifa** pour son aide, encouragement et ses conseils et toutes les personnes qui ont été là pour moi en particulier, **Jedjiga, Hadjer et Aisha** pour leur encouragements et leur précieuse amitié.*

*Merci*

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I.1</b> : Les deux isomères de l'acide lactique.....	18
<b>Figure I.2</b> : Schéma simplifié des réactions du métabolisme fermentaire chez les bactéries lactiques homofermentaires.....	21
<b>Figure I.3</b> : l'effet d'un facteur.....	25
<b>Figure I.4</b> : Domaine de variation du « facteur », constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut.....	26
<b>Figure I.5</b> : l'espace expérimental.....	26
<b>Figure III.1</b> : Evolution de la concentration de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes températures et à pH constant.....	44
<b>Figure III.2</b> : Evolution de la concentration de l'acide lactique en fonction du temps à différentes températures et à pH constant.....	46
<b>Figure III.3</b> : Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes concentration d'extrait de levure.....	48
<b>Figure III.4</b> : Evaluation de la production de l'acide lactique à différentes concentrations d'extrait de levure.....	50
<b>Figure IV.1</b> : Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps dans les conditions opératoire du plan d'expérience.....	56
<b>Figure IV.2</b> : Evolution de la production en fonction du temps dans les conditions opératoires du plan d'expérience.....	58
<b>Figure IV.3</b> : Variation de la réponse dans les conditions du plan d'expérience.....	61
<b>Figure IV.4</b> : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues.....	63
<b>Figure IV.5</b> : Effet du pH et de l'extrait de levure.....	63
<b>Figure IV.6</b> : Diagramme des interactions.....	63

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I.1 :</b> Quelques caractéristiques de différents effluents .....	5
<b>Tableau I.2 :</b> Normes de rejet des effluents.....	6
<b>Tableau I.3:</b> composition du lait et du lactosérum.....	8
<b>Tableau I.4:</b> teneurs en vitamines dans le lactosérum.....	9
<b>Tableau I.5:</b> Composition type (en g/l) de lactosérum acide et doux.....	11
<b>Tableau I.6:</b> Applications du lactosérum dans la transformation des aliments.....	12
<b>Tableau I.7:</b> Effets probables des protéines et peptides du lactosérum sur la santé.....	13
<b>Tableau I.8 :</b> Matrice d'expériences pour un plan factoriel complet ( $2^2$ ).....	29
<b>Tableau I.9 :</b> Formules donnant les effets du plan factoriel $2^2$ .....	30
<b>Tableau III.1:</b> Résultats des analyses effectuées sur le lactosérum brut.....	40
<b>Tableau IV.1 :</b> les niveaux de variation des facteurs.....	54
<b>Tableau IV.2 :</b> les différents essais pour l'établissement du plan d'expérience.....	55
<b>Tableau IV.3 :</b> Matrice d'expérience.....	57
<b>Tableau IV.4 :</b> les coefficients.....	59
<b>Tableau IV.5 :</b> Estimations des coefficients.....	60
<b>Tableau IV.6:</b> Résumé de l'ajustement.....	61
<b>Tableau IV.7 :</b> Analyse de la variance.....	62

# Sommaire :

---

*Dédicaces*

*Remerciements*

**Liste des figures**

**Liste de tableaux**

**INTRODUCTION**

## **CHAPITRE I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **I.1. Industrie laitière**

I.1.1. Spécificité des effluents en laiterie.....	4
I.1.2. Origine des rejets en laiterie.....	4
I.1.3. Principaux paramètres utilisés pour caractériser une pollution.....	4
I.1.4. Impact des effluents laitiers sur l'environnement et leur pouvoir polluant.....	5

### **I.2. Lactosérum**

I.2.1. Définition et caractéristiques.....	6
I.2.2. Source du lactosérum.....	7
I.2.3. Composition du lactosérum.....	7
I.2.4. Les différents types du lactosérum.....	10
I.2.5. Traitement et valorisation.....	11
I.2.6. Procédés de gestion du déchet laitier dans quelques pays.....	14

### **I.3. Bactéries lactiques**

I.3.1. Définition.....	15
I.3.2. Utilisations.....	15
I.3.3. Caractéristiques.....	15
I.3.4. Métabolisme.....	17

### **I.4. Acide lactique**

I.4.1. Définition.....	17
I.4.2. Domaines d'utilisation.....	18

## **I.5. La fermentation lactique**

I.5.1. Définition.....	20
I.5.2. Les différents types de fermentation lactique.....	20
I.5.3. Biochimie de la fermentation lactique.....	20
I.5.3.1.Métabolisme du lactose.....	20
I.5.3.2. Principaux facteurs influençant le métabolisme des bactéries lactiques.....	22

## **I.6. Le plan d'expérience**

I.6.1.Définition.....	23
I.6.2. L'intérêt du plan d'expériences.....	23
I.6.3. Quelques notions :	
I.6.3.1.L'expérience.....	24
I.6.3.2. Réponse, facteur, niveau.....	24
I.6.3.3. L'effet du facteur.....	25
I.6.3.4. Variables codées ou variables centrées réduites.....	25
I.6.3.5. Le domaine de variation de l'espace expérimental.....	26
I.6.3.6. Le domaine d'étude.....	27
I.6.3.7.Surface de réponse.....	27
I.6.3.8. L'interaction dans le cas de deux facteurs.....	27
I.6.4. Les plans d'expériences.....	27
I.6.4.1.Plans factoriels complets.....	27
I.6.4.2.Plans factoriels complet à deux facteurs ( $2^2$ ).....	28
I.6.4.3.Modélisation mathématique.....	29
I.6.4.3.1.Matrice d'expérience.....	30
I.6.4.3.2.Calcul des effets.....	30
I.6.4.3.3. Analyse de la variance et validation du modèle.....	30
I.6.4.3.4. Analyse de la corrélation.....	30
I.6.4.3.5. Seuil de confiance.....	30
I.6.4.3.6.Les tests de statistique.....	31
I.6.4.3.7. Le t-Student.....	31
I.6.4.3.8.Le test de Fisher .....	31
I.6.5. Logiciels des plans d'expérience.....	31

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

### **II.1. Matériel**

II.1.1. Matériel biologique.....	34
II.1.2. Milieu de culture.....	34
II.1.3. Produits et matériel utilisés .....	34

### **II.2 Méthodes d'analyse**

II.2.1. Analyses effectuées sur lactosérum brut.....	34
II.2.2. Valorisation .....	34
II.2.2.1. La fermentation.....	35
II.2.2.2. Mesure de la croissance bactérienne .....	35
II.2.2.3. Dosage de l'acide lactique.....	36
II.2.3. Méthode du plan d'expériences.....	37

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>III.1. Evaluation du lactosérum brut Boudouaou.....</b>	<b>40</b>
<b>III.2. Valorisation du lactosérum.....</b>	<b>43</b>
III.2.1. Effet de la température.....	43
III.2.1.1. La croissance bactérienne.....	43
III.2.1.2. Production de l'acide lactique.....	46
III.2.2. effet de l'extrait de levure.....	48
III.2.1.1. La croissance bactérienne.....	48
III.2.1.2. Production de l'acide lactique.....	50

## **CHAPITRE IV : LE PLAN D'EXPERIENCE**

<b>IV.1. Définition des niveaux de facteurs.....</b>	<b>53</b>
<b>VI.2. Expression des résultats et interprétations.....</b>	<b>55</b>
<b>IV.3. Modélisation.....</b>	<b>58</b>
IV.3.1. Analyse statistique .....	58
IV.3.2. Evaluation des coefficients.....	59
IV.3.2. Validation du modèle.....	61

**IV.3.Représentation graphique de effets.....62**

**CONCLUSION**

# INTRODUCTION

De nombreux sous-produits de l'industrie alimentaire sont rejetés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution.

L'industrie laitière en est une de l'activité agro-alimentaire. En effet, à l'origine de la production de grandes quantités de lactosérum dont la gestion constitue un problème d'importance cruciale, sont actuellement rejetées dans les eaux résiduaires des usines, engendrant un problème de pollution environnementale.

Cette pollution est très dommageable en raison de la forte demande en oxygène des produits rejetés et de l'asphyxie du milieu qui peut en résulter. Elle se caractérise par une absence presque totale d'éléments toxiques mais elle présente une tendance forte à l'acidification et à la fermentation rapide.

Le lactosérum attire de plus en plus l'attention des chercheurs avec sa richesse en nutriments, son énorme pouvoir polluant qui détériore l'environnement. Il est devenu le centre d'intérêt de plusieurs recherches et plusieurs procédés de valorisation sont mis en évidence afin de remédier à ce grand problème.

La richesse du lactosérum en éléments nutritifs fait de lui un excellent milieu de culture pour les microorganismes.

La fermentation lactique conduisant à la production de l'acide lactique par l'usage des bactéries lactiques sur le lactosérum comme milieu de culture est une voie de dépollution et de valorisation qui a fait son apparition ces dernières années.

L'acide lactique possède une large utilisation dans plusieurs secteurs : alimentaires, industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques...etc.

Dans le but de contribuer à l'étude de la valorisation du lactosérum, nous avons étudié sa fermentation en acide lactique par *Lactococcus lactis subsp lactis*, une souche bactérienne sélectionnée pour son pouvoir acidifiant.

Notre étude a porté sur :

- La caractérisation et l'évaluation du degré de pollution du lactosérum brut qui provient de l'O.R.L.A.C de Boudouaou.
- L'étude des effets de différents paramètres sur la croissance bactérienne et la production de l'acide lactique (température, extrait de levure, pH).
- L'établissement d'un modèle mathématique représentant la vitesse de production de l'acide lactique en établissant un plan d'expérience.

**CHAPITRE I**  
**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I.1.INDUSTRIE LAITIERE**

### **I.1.1. Spécificité des effluents :**

Comme toutes les industries agro-alimentaires, les industries laitières génèrent une pollution organique essentiellement biodégradable provenant des pertes de matières premières au cours du traitement et de la transformation du lait et les produits de nettoyage utilisés. Cependant, la très forte concentration de ces rejets organiques rend impossible le rejet pur et simple dans le milieu naturel (Moletta et Torrijos, 2001).

### **I.1.2. Origine des rejets en laiterie :**

La composition des effluents laitiers dépend de la nature du produit formé et donc des procédés mis en œuvre dans la laiterie :

- Les ateliers de pasteurisation du lait ne déversent que des eaux de lavage, correspondant à un lait très dilué.
- L'industrie des produits frais (yaourts et fromages frais) rejettent des eaux qui peuvent être assez concentrées.
- Les fromageries et caséineries produisent du sérum riche en lactose et pauvre en protéines, les beurreries du babeurre riche en lactose et en protéine mais pauvre en matière grasse. Le babeurre et le sérum correspondent à une pollution considérable.

### **I.1.3. Principaux paramètres utilisés pour caractériser la pollution :**

Les principales grandeurs caractérisant la pollution sont :

- La demande biologique en oxygène en 5 jours ( $DBO_5$ ) : 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.
- La demande chimique en oxygène (DCO) : elle permet de quantifier la teneur en matière oxydable de l'effluent.
- Les matières en suspension (MES) et matières volatiles en suspension (MVS)
- Les matières sèches totales (MST)
- L'azote

- Le phosphore
- Le pH (acidité) : Cette caractéristique est importante car les microorganismes qui sont utilisés dans des systèmes de dépollution ne fonctionnent correctement que dans une gamme réduite de pH (entre pH 5 et pH 6).
- L'équivalent habitant (EH) : Cela permet de comparer l'impact des effluents par rapport aux rejets domestiques. 1 EH = 57g de matière organique

#### **I.1.4. Impact des effluents laitiers sur l'environnement et leur pouvoir polluant :**

Les effluents laitiers ont 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, génération d'odeurs indésirables dues à la fermentation, graves perturbations des cycles biologiques et du milieu naturel lorsqu'elles sont en trop grande quantité (l'eutrophisation).

**Tableau I.1 : Quelques caractéristiques de différents effluents (Harang, 2010) :**

Type de l'effluent	pH	Volume/litre de lait	DCO(g/L)	DCO/DBO <sub>5</sub>
<b>Eaux blanches</b>	5,5 à 6	3,0 à 4,0	2,0 à 3,0	1,3 à 1,4
<b>Lactosérum ou petit lait</b>	4,2	0,75	50 à 70	1,5
<b>Mélange lactosérum +eaux blanches</b>	4,0 à 4,5	4,0 à 5,0	10 à 12	1,7 à 1,8
<b>Effluent domestique</b>	7,0 à 8,0	150 L/EH	0,8 à 1	1,9

**Tableau I.2 : Normes de rejet des effluents (Sottiez, 1985) :**

	Normes pour rejeter ou épandre les effluents	Eaux blanches
DCO (mg/l)	120	2000-3000
DBO <sub>5</sub> (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

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 (Sottiez, 1985).

De plus, un litre de lait transformé induit 60 g de DCO dont 50 g issus du lactosérum (qui est la partie la plus polluante de la charge organique) et seulement 10 g des eaux blanches (Harang, 2010). Le lactosérum a un impact environnemental beaucoup plus important, il possède une DBO de 30 à 60 g/l (Sottiez, 1985).

La DBO<sub>5</sub> d'une eau domestique est évaluée à 300 mg/l et elle est estimée à 200 litres le volume d'eau utilisée par habitant et par jour. Dans ce cas, un équivalent habitant est égal à 60 grammes d'oxygène, soit la DBO<sub>5</sub> d'un litre de lactosérum.

De ce fait, les effluents issus de l'industrie laitière doivent subir un traitement avant rejet dans la nature et une séparation préalable des eaux blanches et le coproduit est recommandée pour un traitement plus facile.

## **I.2. LE LACTOSERUM**

### **I.2.1. Définition et caractéristiques :**

Le lactosérum est la phase aqueuse (Snappe et al, 2006) jaune verdâtre translucide qui se sépare du caillé après la coagulation du lait durant la fabrication du fromage et de la caséine.

C'est un milieu dilué complexe contenant essentiellement du lactose, des protéines globulaires, une fraction azotée non protéique, de la matière grasse et des minéraux. Sa composition dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines (Voilleau, 2009).

Sa principale caractéristique est qu'il contient beaucoup de lactose, ce sucre représente une principale source de carbone pour les microorganismes qui intéressent l'industrie agroalimentaire.

### **I.2.2. Source du lactosérum:**

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie.

#### **- La beurrerie :**

C'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation, on obtient du « lactosérum écrémé ».

#### **- La fromagerie :**

C'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait nature. Ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant d'une part à une phase solide le « fromage », d'une part, à une phase liquide qui est le lactosérum (Veisseyere, 1975).

### **I.2.3. Composition du lactosérum :**

La composition du lactosérum dépend du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. Il peut être considéré comme du lait dépourvu de matière grasse et de caséines, sa couleur jaune verdâtre est due à sa teneur élevée en vitamine B2 (Voilleau, 2009).

**Tableau I.3: composition du lait et du lactosérum (Sottiez, 1985) :**

Constituants en g/l	Lait	Lactosérum
M. grasse	38	4
Caséine	26	-
Lactose	49	49
Azote non protéinique + protéines solubles	8	8
Sels minéraux	8	5
Total M. sèche	129	66

Comme nous montre le tableau, le lait et le lactosérum ont presque la même composition, à part que le lactosérum est pauvre en matières grasses et sa fraction protéique ne contient plus de caséines puisque celles-ci sont passées dans le fromage

Le lactosérum est donc composé essentiellement de :

**- 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 (Vrignaud, 1979).

**- Les protéines :**

Les protéines du lactosérum sont faciles à digérer, contiennent tous les acides aminés essentiels en proportions adéquates et constituent une excellente source de nutrition. En fait, elles fournissent voire dépassent la quantité quotidienne recommandée de chaque acide aminé essentiel (Vioilleau, 2009), elles constituent à l'état concentré, des sources de protéines

recherchées tant par l'alimentation des jeunes animaux que pour l'alimentation humaine (Pierre et Fauquant, 1986).

On les distingue des caséines par leur composition, leur structure et diverses propriétés :

- Leur teneur élevée en lysine, tryptophane, cystéine et méthionine leur confère une très bonne valeur nutritionnelle ;
- La structure est plus compacte : ces protéines fixent peu les ions et résistent à l'action des protéases ;
- Elles sont plus sensibles à la chaleur car dénaturées par chauffage (à 100°C) et forment des flocons, elles deviennent alors insolubles (sauf les protéoses-peptones).

**- Les vitamines :**

Le lactosérum contient les vitamines hydrosolubles (vitamines B et C) parmi lesquelles on trouve des quantités importantes de riboflavine (B2); d'acide pantothénique (B5); thiamine (B1); de pyridoxine (B6) et l'acide ascorbique (Woo, 2002).

**Tableau I.4 : Teneurs en vitamines dans le lactosérum (Linden et Lorient, 1994) :**

Vitamines	Concentration (mg/ml)
- Thiamine	0,38
- Riboflavine	1,20
- Acide nicotinique	0,85
- Acide pantothénique	3,4
- Pyridoxine	0,42
- Cobalamine	0,03
- Acide ascorbique	2,2

**- La matière grasse:**

La matière grasse du lait est retenue par le caillé dans la fabrication des 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.

**- 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 (Fersadou, 2009).

**I.2.4. Différents types de lactosérum :**

Les différences de composition minérale et protéique des lactosérums sont en premier lieu à rattacher aux variations qualitatives des laits et en second lieu, à la diversité des technologies fromagères. Pour un même fromage, les lactosérums peuvent même différer selon l'usine (Saulnier et al, 1995).

On peut distinguer deux types de lactosérum :

**- Le lactosérum doux :**

Il provient de la fabrication des fromages de type pâte pressée cuite ou non cuite et présente un pH compris entre 5 et 6.

la coagulation du lait provient de la déstabilisation des micelles de caséines sous l'action de la présure (Violleau, 2009).

**- Le lactosérum acide :**

il est obtenu après coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4,6

Le lactosérum acide contient plus de calcium que le lactosérum doux étant donné que lors de l'acidification du lait, le calcium passe dans la phase liquide, c'est-à-dire le petit lait .

La différence de composition de ces 2 types de lactosérum est représentée dans le tableau I.5

**Tableau I.5. : Composition type (en g/l) de lactosérum acide et doux (Violleau, 2009) :**

	Lactosérum doux	Lactosérum acide
pH	6,1- 6,7	4,6-6
Matière sèche	71	65,8
Matières grasses	2,0	4,0
Lactose	49,0	44,0
Azote non protéique	0,5	0,2
Protéines	8,0	7,0
Acide lactique	2,0	5,0
Acide citrique	1,3	0,3
Minéraux	5,0	8,0
Dont Phosphore	0,41	0,65
(entre autre) Calcium	0,47	1,25
Potassium	1,45	1,48
Sodium	0,5	0,53
Chlorures	2,19	2,09

### **I.2.5. Traitement et valorisation du lactosérum :**

Longtemps considéré comme un déchet, le lactosérum était épandu dans les champs ou utilisé tel quel pour l'alimentation animale et dans la plupart du temps, il est rejeté dans les eaux résiduaires des usines laitières.

Nous assistons à des rejets énormes du lactosérum par les industries fromagères. Elles génèrent plus de 145 millions de tonnes de lactosérum liquide par année (Audic et al, 2003). Ces rejets constituent une menace réelle sur l'environnement de part sa richesse en matières organiques, en particuliers, le lactose 40% (Alais, 1984).

La pollution causée par 1000 m<sup>3</sup>/ jour d'eaux usées rejetées par une industrie laitière serait équivalente à celle d'une ville de 800 000 habitants (Kosikowski, 1977). Dans ces conditions, il est devenu indispensable de le recycler pour éviter la menace polluante.

Or, les recherches effectuées par la plupart des pays laitiers ont mis en évidence sa valeur nutritionnelle, ainsi que les possibilités de son utilisation dans plusieurs domaines (Luquet et Boudier, 1984) :

- **l'alimentation :**

Une quantité considérable de lactosérum est utilisée dans l'alimentation animale, il constitue aussi un ingrédient alimentaire à valeur ajoutée, utilisé dans une vaste gamme d'aliments et de boissons (Woo, 2002). De plus, il est utilisé pour enrichir les aliments ou les régimes pauvres en protéines. En pathologie, il est utilisé pour l'alimentation des malades diabétiques ou des sujets souffrant de mal nutrition et en alimentation de soutien pour les sportifs, les personnes âgées (Dryer, 2001).

**Tableau I.6: Applications du lactosérum dans la transformation des aliments (Woo, 2002) :**

Propriété fonctionnelle	Mode d'action	Produits alimentaires
Solubilité / hydratation	Les protéines fixent/ encapsulent l'eau	Viandes, boissons, pains, gâteaux, saucisses
Gélatine / viscosité	Formation et coagulation de matrices de protéines	Vinaigrettes, soupes, coagulation de fromages, produits de boulangerie, sauces, viandes
Émulsification	Les protéines stabilisent les émulsions de matière grasse.	Saucisses, soupes, gâteaux, vinaigrettes, aliments pour bébé, colorants à café.
Moussage / fouettage	Les protéines forment une pellicule stable	Garnitures de crème fouettée, gâteaux mousseline, desserts
Goût / arôme / brunissement	Le lactose subit une réaction de Caramélisation	Produits de confiserie, viandes cuites au four à micro-ondes, saucisses, pains, produits de boulangerie, soupes, produits laitiers

**- la médecine :**

Depuis une dizaine d'années, les scientifiques évaluent les effets bénéfiques des fractions de protéines de lactosérum. L'utilisation de ces fractions est efficace contre les maladies du cœur (réduction du cholestérol et de la tension artérielle), les ulcères, les cancers, etc. (Berry, 2000).

**Tableau I.7: Effets probables des protéines et peptides du lactosérum sur la santé (Woo, 2002) :**

Protéine ou peptide	Activité probable
	Lactosérum doux
Beta-lactoglobuline	Facilite la digestion
Beta-lactorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Alpha-lactalbumine	Anti-cancérigène
Alpha-lactorphine	Augmente le contrôle de la douleur
Lactoferrine	Antimicrobien (antibactérien / antiviral)  Contrôle le transport du fer  Stimule le système immunitaire  Anti-inflammatoire  Favorise la croissance des cellules  Anti-cancérigène
Lactoferricine	Antimicrobien
Immunoglobuline	Immunité passive
Lactoperoxydase	Antibactérien
Sérum-albumine	Augmente le contrôle de la douleur
Sérorphine	
Glycomacropéptide*	Facilite la digestion
Facteurs de croissance	Différenciation cellulaire  Protection, réparation des cellules du tube digestif Réparation des plaies

(\*peptide dérivé de la caséine qui apparaît lors de la fabrication du fromage)

- **La biotechnologie :**

le lactosérum par sa composition biochimique possède d'intéressantes propriétés comme milieu de fermentation pour plusieurs microorganismes assimilant le lactose comme source de carbone et d'énergie. A titre d'exemple, la culture des levures de bière, *Saccharomyces*.

- **L'agriculture :**

Epannage direct ou après compostage (Le Bihan, 2011).

**I.2.4. Procédés de gestion du déchet laitier (le lactosérum) dans quelques pays (Bremerhaven, 2011) :**

**1) Algérie :**

Les procédés de gestion utilisés :

- Rejet des eaux blanches dans les réseaux d'assainissement.
- Rejet dans les stations d'épuration.
- Boisson du lactosérum.
- Ingrédient dans les biscuits

**2) Maroc :**

- Rejet dans le milieu naturel sans traitement préalable.

**3) Tunisie :**

- Rejet dans les stations d'épuration.
- Usage en boisson protéique.
- Alimentation animale (bien que jugé de mauvaise qualité pour les bovins)

**4) A l'échelle internationale :**

- Alimentation animale.
- Boissons à base de lactosérum.
- Utilisation sous forme concentrée.
- Utilisation sous forme déshydratée.

- Lactosérum modifié
  - Déminéralisation
  - Dé lactosage.
  - Extraction des protéines stériques
  - Hydrolyse du lactose.
- Utilisation comme milieu de culture : le lactosérum liquide est un excellent substrat de fermentation pour la production de protéines unicellulaires (P.U.C) ou de métabolites (Bremerhaven, 2011).

### **I.3. LES BACTERIES LACTIQUES**

#### **I.3.1. Définition :**

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Elles appartiennent à divers genres comme *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissenna* et elles ont été sélectionnées à partir de lait de vache, de jus de presse de canne à sucre avant et après chaulage (Atlan et al, 2000).

#### **I.3.2. Utilisations :**

Les bactéries lactiques interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires : saumurage des légumes, boulangerie, fabrication du vin, saurissage des poissons, des viandes et des salaisons, etc.

Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production de composés aromatiques.

Elles fermentent les glucides en acide lactique, d'où une diminution du pH favorable à la conservation des aliments (Labioui et al, 2005).

#### **I.3.3. Caractéristiques :**

Les bactéries lactiques sont des cellules vivantes, procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes, ne se développent qu'en présence de substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques.

Les bactéries lactiques ont pour principales caractéristiques d'être :

Gram +, en général immobiles, asporulées, anaérobies mais aérotolérantes, catalase (-) (certaines bactéries possèdent des pseudo-catalase), nitrate réductase(-).

En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine.

Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Deroissart, 1990 ; Leveau et al. 1993).

Selon Dellaglio et al (1994), toutes les bactéries ont un métabolisme fermentaire strictement saccharolytique qui en utilisant les glucides peuvent produire :

- L'acide lactique (bactéries homolactiques strictes).
- Acide lactique et acétique (bactéries hétérolactiques facultatives).
- Acide lactique, acétique, l'éthanol et CO<sub>2</sub> (bactéries hétérolactiques strictes).

Le genre *Lactococcus*, qui nous intéresse plus particulièrement, était autrefois apparenté aux streptocoques. Il s'agit donc de bactéries en forme de coques, regroupées ou non en chaînettes de longueurs variables. Elles présentent un métabolisme homolactique, aucune activité  $\beta$ -hémolytique, et sont mésophiles puisque leur température optimale de croissance est proche de 30°C. Ce sont les études de Schleifer et al. (1985) qui ont justifié la création de ce nouveau genre bactérien regroupant la quasi-totalité des streptocoques du groupe N de la classification de Lancefield.

Le genre *Lactococcus* inclut différentes espèces :

- *garviae* ;
- *lactis* ;
- *piscium* ;
- *plantarum* ;
- *raffinolactis* ;

L'espèce *lactis* regroupe elle-même trois sous-espèces :

- *cremoris* ;
- *lactis* ;

L'espèce *lactococcus lactis* subsp *lactis* au mécanisme homofermentaire possède un optimum de croissance de 30°C et ne pousse pas à pH 9,6 et ne produit que l'acide lactique (L+).

Les habitats les plus importants des lactocoques demeurent le lait, les laits fermentés ainsi que les fromages où ils constituent la flore dominante. Cependant, on peut également les isoler des plantes ainsi que de la peau de certains Animaux (Jomaa, 2007).

#### **I.3.4. Métabolisme :**

*Lactococcus lactis subsp lactis* a un rôle majeur dans l'acidification des fromages par production d'acide lactique.

Elle contribue aussi à la texture par production d'exopolysaccharides et à la saveur par production de composés aromatiques (alcools, aldéhydes, cétones) par dégradation de citrates ou des acides gras (Engels et Visser, 1996).

Dotée de protéases membranaires et de peptidases, elle est capable de fermenter les protéines et les peptides.

Elle métabolise également des acides aminés en composés aromatiques (aldéhydes, alcools, composés soufrés).

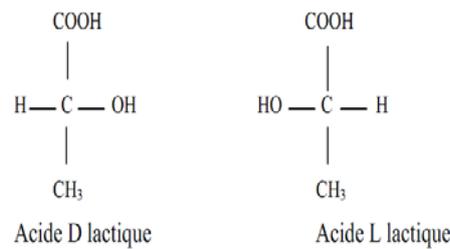
Elle peut aussi produire du diacétyl. Ses potentialités métaboliques sont de plus en plus explicitées grâce à l'exploitation des séquences du génome disponible (Jomaa, 2007).

### **I.4. L'ACIDE LACTIQUE**

#### **I.4.1. Définition :**

L'acide lactique est un acide organique naturel obtenu par dégradation du lactose par les bactéries lactiques.

L'acide lactique ou acide  $\alpha$  hydroxy propionique, se présente sous deux formes optiquement actives dues à la présence d'un carbone asymétrique situé en  $\alpha$  de la fonction acide. La configuration L (+) est lévogyre et la configuration D (-) est dextrogyre (Figure I.1).



**Figure I.1: Les deux isomères de l'acide lactique (Jarry 1994).**

L'isomère acide L lactique est préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de L lactate déshydrogénase dans l'être humain (Naveena et al, 2004).

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.

#### **I.4.2. Domaines d'utilisation :**

L'acide lactique trouve diverses applications dans les industries chimiques, alimentaires et pharmaceutiques (FAO / OMS, 1977). Il est également utilisé notamment dans la production de polymères biodégradables ( Corbiere, 1978).

##### **- l'industrie alimentaire :**

Il est utilisé comme conservateur E270 ou comme acidulant, seul ou en combinaison avec d'autres acides. Il intervient dans presque tous les aliments et boissons grâce à son léger goût acide qui ne masque pas les saveurs naturelles aromatiques. L'acide lactique et ses sels sont reconnus comme additifs alimentaires dans de nombreux produits comestibles tels que: bonbons, saumures, choucroutes, boissons non alcoolisées, eaux minérales, jus de fruit...etc.

Exemple:

- En fromagerie : il est utilisé pour régler le pH du lait avant l'emprésurage.
- En boulangerie: il est utilisé comme émulsifiant sous la forme de stéaroyllactoyllactate de sodium (Jarry, 1994).

**- le secteur pharmaceutique et médical :**

Le lactate de calcium possède une action thérapeutique, tandis que les sels de métaux lourds servent d'opacifiant en imagerie médicale.

Sous forme de polymères ou copolymère lactiques-glycoliques, il est utilisé pour la libération contrôlée des médicaments dans des fibres creuses, elles-mêmes biodégradables. Cet aspect avantageux est encore mis à profit dans des implants chirurgicaux ou des fils de suture (Jarry, 1994).

**- 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 (Wehrmüller et Liebefeld, 2009).

**- Secteurs industriels divers: (textile, tannerie et l'œnologie):**

Ces industries l'utilisent soit comme agent de mordantage, soit dans le déchaulage des peaux. Les polymères de l'acide lactique sont thermoplastiques et résistants, facile à façonner et biodégradables donnant des produits naturels et sans danger (Jarry, 1994).

La production d'acide lactique par des micro-organismes s'est bien développée ces dernières années. Cependant, elle utilise souvent des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux, tels que l'extrait de levure, le glucose ou le lactose. Par ailleurs, un grand nombre de milieux ont été mis au point et étudiés pour la production de l'acide lactique (Jomaa, 2007).

## **I.5. LA FERMENTATION LACTIQUE**

### **I.5.1. Définition :**

La fermentation lactique peut être définie comme un procédé de fermentation dans lequel interviennent des bactéries lactiques qui croissent sous des conditions anaérobies et utilisent les sources de carbone pour produire de l'acide lactique comme seul ou majeur acide organique (Yao et al, 2009).

### **I.5.2. Les différents types de fermentation lactique :**

On trouve deux types de fermentations lactiques :

#### **- Fermentation lactique homofermentaire**

Elle est due à des bactéries qui produisent de l'acide D(-) lactique pur, du L(+) lactique pur, ou un mélange racémique des deux, grâce à l'action de deux lactates déshydrogénases (L et D) ou à la présence d'une racémase. Seul l'acide L(+) lactique est métabolisé par l'organisme humain et par les autres bactéries, de ce fait, on se limite à l'emploi de souches qui produisent l'acide L (+) et le mélange racémique DL (Leveau et al, 2001 ) et la quantité produite est variable selon la tolérance des souches aux pH bas.

#### **- Fermentation lactique hétérofermentaire**

Les bactéries qui la réalisent sont proches des précédentes. La présence d'autres produits que l'acide lactique est souvent considérée comme une cause d'altération, notamment le dégagement de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> qui peut entraîner le gonflement des produits en salaisons ou encore l'apparition d'une multitude de trous de petite taille en fromagerie (accident « mille trous »). Cependant, elle peut aussi être considérée comme une source d'arômes grâce à la diversité des produits formés (Branger, 2004 ).

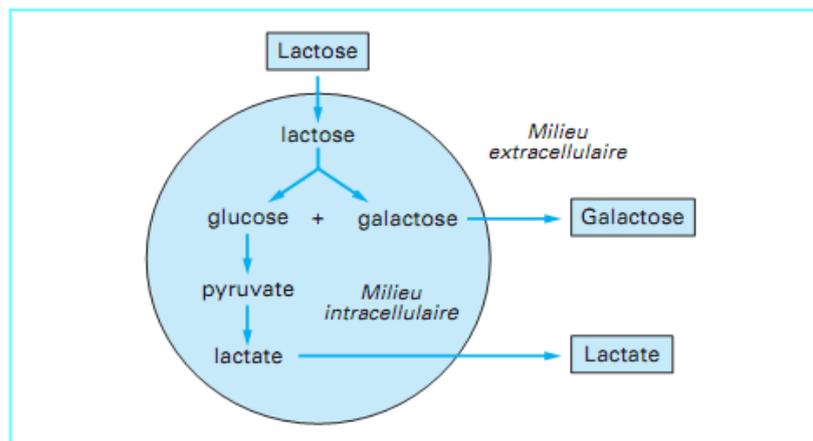
### **I.5.3. Biochimie de la fermentation lactique**

#### **I.5.3.1. Métabolisme du lactose**

Les bactéries lactiques utilisent les nutriments du lait pour se développer et produire des métabolites d'intérêt. Ces réactions relèvent principalement du catabolisme (dégradation du lactose). Elles sont essentielles au déroulement de la fermentation lactique et pour obtenir un produit de bonne qualité en termes de finesse et de stabilité. Certaines réactions de

l'anabolisme sont également importantes puisqu'elles participent à la production de polysaccharides, de composés aromatiques ou de molécules ayant un rôle de conservation (Béal et Sodini, 2007).

La dégradation du lactose en acide lactique représente la fonctionnalité la plus importante des bactéries lactiques. Elle se déroule en quatre étapes, schématisées sur la figure I.3.



**Figure I.2. : Schéma simplifié des réactions du métabolisme fermentaire chez les bactéries lactiques homofermentaires (Beal et Sodini, 2007).**

- l'entrée du lactose dans la cellule est réalisée grâce à l'activité d'une enzyme membranaire : lactose perméase-dépendante de la force proton-motrice ou phosphotransférase, dépendante du phosphoénolpyruvate ;
- le lactose est hydrolysé en glucose et galactose sous l'action d'une enzyme ( $\beta$ -galactosidase ou phospho $\beta$ -galactosidase. Chez *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, le galactose est excrété hors de la cellule alors que chez les bactéries lactiques mésophiles, il est métabolisé en pyruvate. Le bilan énergétique de ces réactions est égal à deux molécules d'ATP (adénosine triphosphate) par molécule de lactose, ou à quatre, si le galactose est métabolisé ;
- le pyruvate est réduit en lactate par une réaction catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase. Cette réaction permet en outre de réoxyder le cofacteur  $\text{NAD}^+$  précédemment réduit ;

- finalement, le lactate est expulsé hors de la cellule, en symport avec des protons. L'accumulation de ce lactate provoque une inhibition de la croissance bactérienne et de sa propre production, qui s'arrêtent de façon précoce, bien avant l'épuisement des substrats. Cette inhibition est liée, à la fois, à l'accumulation de l'acide lactique et à la diminution du pH du milieu intracellulaire qui en résulte.

### **I.5.3.2. Principaux facteurs influençant le métabolisme des bactéries lactiques:**

La croissance et l'acidification des bactéries lactiques sont fortement influencées par des facteurs physiques, chimiques et microbiologiques. En outre, les effets de ces facteurs peuvent interagir sur leur activité métabolique (**Beal et Sodini, 2007**).

#### **- Facteurs physiques**

- **La température** : elle est le premier facteur environnemental à considérer pour le développement des bactéries lactiques. Elle agit sur les vitesses des réactions chimiques et biochimiques. Elle doit se trouver autour de 30°C pour les bactéries mésophiles et autour de 42 °C pour les espèces thermophiles.
- **L'activité de l'eau (aw)** : elle est liée à la présence de sels ou de sucres. Lorsqu'elle diminue, la quantité d'eau libre décroît et la disponibilité des nutriments est affectée. Concernant les laits fermentés, seule la présence de saccharose (cas des yaourts sucrés) peut diminuer cette activité de l'eau. Ainsi, lorsque l'aw devient inférieur à 0,99, ce qui correspond à une concentration en saccharose de 10 %, l'activité métabolique des bactéries est affectée.

#### **- Facteurs chimiques**

- **Les milieu de culture** : Le milieu de culture est un facteur prépondérant pour le développement des bactérie et la limitation en certaines molécules peut constituer un frein à la croissance.
- **Le traitement thermique** : Le traitement thermique subi par le lait avant l'étape de fermentation va agir favorablement sur le métabolisme des bactéries. En effet, outre son rôle principal de destruction des micro-organismes indésirables et pathogènes, il permet de détruire les principales

substances antibactériennes naturellement présentes dans le lait (agglutinines, lactoperoxydases) ce qui favorisera les croissances bactériennes. De plus, il génère de faibles quantités d'acide formique à partir du lactose, ce qui stimulera la croissance des lactobacilles. Enfin, il contribue à l'augmentation de la teneur du lait en petits peptides et en acides aminés libres.

#### **- Le pH :**

Le pH est le troisième facteur chimique important pour la croissance des bactéries lactiques. Il intervient sur la disponibilité en nutriments du milieu, sur la perméabilité de la membrane cellulaire et sur les vitesses d'activité enzymatique. Lors de la production de yaourt, il n'est pas contrôlé et représente donc un facteur majeur de ralentissement du métabolisme bactérien.

## **I.6. LE PLAN D'EXPERIENCES :**

Afin de gagner du temps, donner des informations fiables, économiser les essais, le statisticien britannique Ronald Fisher inventa le plan d'expérience (Sadou, 2000).

### **I.6.1. Définition :**

Un plan d'expériences consiste en la mise en œuvre organisée d'un ensemble d'unités expérimentales de manière à révéler les effets de différents traitements (Pierre, 2008), il permet d'obtenir le maximum de renseignement avec le minimum d'expériences donc un gain en temps et en coût (Goupy, 2001) et cela en suivant des règles Mathématiques et en adoptant une démarche rigoureuse (Sado, 2000).

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles: celle d'espace expérimental et celle de modélisation mathématique des grandeurs étudiées.

### **I.6.2. L'intérêt des plans d'expériences :**

Les plans d'expériences sont utiles à toutes les personnes qui entreprennent des recherches scientifiques ou des études industrielles. Ils sont applicables à toutes les disciplines et à toutes

les industries à partir du moment où l'on recherche le lien qui existe entre une grandeur d'intérêt  $Y$ , et des variables  $x_j$  qui peuvent modifier la valeur de celle-ci (Goupy, 2000).

L'utilisation des plans d'expériences vise aux buts suivants :

- Détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé ;
- Diminution du nombre des essais ;
- Nombre de facteurs étudiés très grand ;
- Détection des interactions entre facteurs ;
- Détection des optimaux ;
- Meilleure précision sur les résultats ;
- Optimisation des résultats ;
- Modélisation des résultats ;
- Prédiction par modélisation du comportement d'un procédé ;
- Optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure ;
- Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité.

### **I.6.3. Quelques notions :**

#### **I.6.3.1. Expérience :**

Une expérience est un essai effectué pour étudier un phénomène, vérifier une hypothèse, une loi et arriver à une connaissance théorique de la façon dont se passent les choses, elle est définie par un ensemble de conditions opératoires et elle est souvent caractérisée par des paramètres d'entrées et ceux de sortie (Pillet, 2001).

#### **1.6.3.2. Réponses, facteurs, niveaux :**

Un phénomène peut toujours être mis sous la forme mathématique suivante :

$$Y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

Avec :

- **Y**: grandeur à laquelle s'intéresse l'expérimentateur : cette grandeur est appelée la réponse ou la grandeur d'intérêt.
- **x<sub>i</sub>** : variables sur lesquelles l'expérimentateur peut agir ; ces variables peuvent être continues ou discontinues ; on les appelle les facteurs.
- **f** : fonction mathématique qui explique le mieux les variations de la réponse selon les différentes valeurs données aux **x<sub>i</sub>**.

### I.6.3.3. L'effet d'un facteur

On appelle effet global d'un facteur la variation de la réponse quand le facteur passe du niveau -1 au niveau +1 et l'effet moyen est défini comme étant la moitié de l'effet global. On dit qu'il y a interaction entre deux facteurs si l'effet moyen de l'un n'est pas le même suivant que l'on se place au niveau bas ou au niveau haut de l'autre (Goupy, 2000).

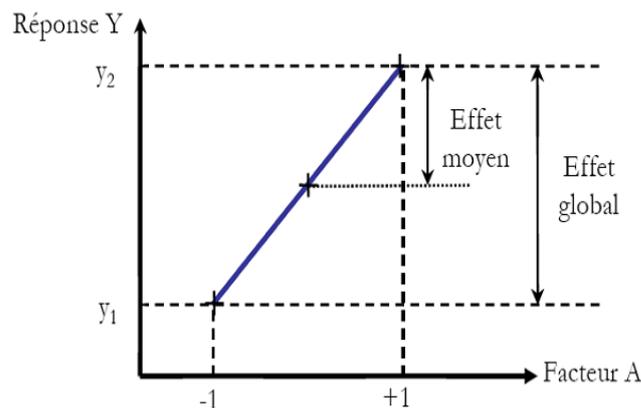


Figure I.3: l'effet d'un facteur

### I.6.3.4. Variables codées ou variables centrées réduites :

On utilise des variables codées qui proviennent de la transformation des variables d'origine en attribuant la valeur « - 1 » au niveau bas d'un facteur et la valeur « + 1 » au niveau haut. L'utilisation des variables codées a pour conséquences de permettre la standardisation des effets des facteurs facilitant ainsi leur comparaison.

Le passage des variables d'origine A aux variables codées x, et inversement, est donné par la formule suivante (Goupy et Lee, 2006) :

$$x = \frac{A - A_0}{Pas}$$

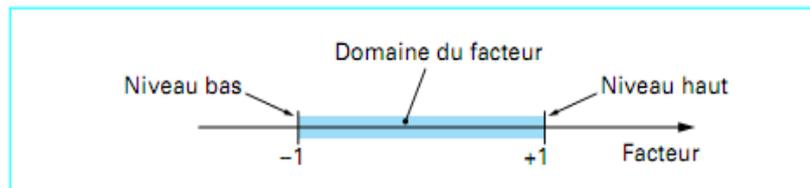
Tel que :

$$- \text{Pas} = \frac{A_{+1} - A_{-1}}{2}$$

- $A_0$  est la valeur centrale en unités courantes

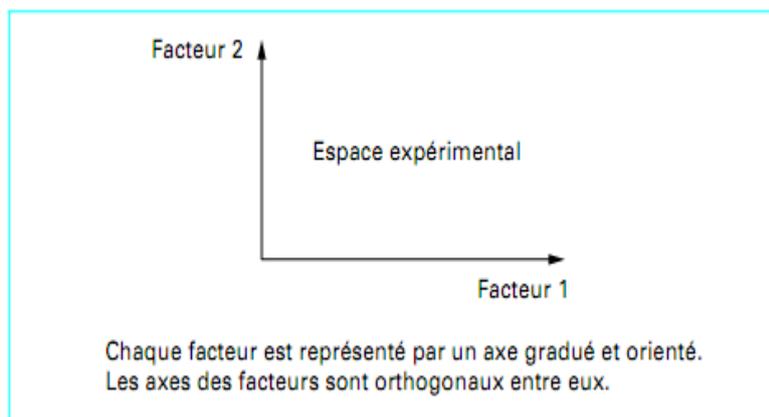
### I.6.3.5. Le domaine de variation et L'espace expérimental (Goupy, 2000):

C'est l'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, on l'appelle le domaine de variation du facteur, ou plus simplement, le domaine du facteur qui peut être représenté par un axe gradué et orienté (figure I.5.) et cela dans le cas où il y'a qu'un seul facteur.



**Figure I.5 : Domaine de variation du « facteur », constitué de toutes les valeurs comprises entre le niveau bas et le niveau haut (Goupy, 2000)**

Dans la mesure où il y aurait un second facteur, il sera représenté aussi par un axe gradué orthogonal au premier facteur. On obtient ainsi un repère cartésien qui définit un espace euclidien à deux dimensions. Cet espace est appelé l'espace expérimental (Figure I.6).



**Figure I.6: l'espace expérimental (Goupy, 2000)**

### **I.6.3.6. Le domaine d'étude :**

La réunion des domaines de chaque facteur définit le « domaine d'étude ». Ce domaine d'étude est la partie de l'espace expérimental retenu par l'expérimentateur pour faire ses essais.

### **I.6.3.7. Surface de réponse :**

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine expérimental correspond un ensemble de réponses qui définit une surface appelée « Surface de réponse » qui représente donc le comportement de la réponse lorsque les niveaux des facteurs varient (Goupy, 2011).

### **I.6.3.8. L'interaction dans le cas de deux facteurs :**

On parle d'interaction entre deux facteurs A et B quand l'effet du facteur A sur la réponse va dépendre de la valeur du facteur B, soit l'un des facteurs renforce l'effet de l'autre. C'est le couplage entre les facteurs. En outre, on dit qu'il ya interaction entre deux facteurs si l'effet moyen de l'un n'est pas le même suivant que l'on se place au niveau bas ou au niveau haut de l'autre.

L'interaction entre deux facteurs X1 et X2 sera considérée comme un nouveau facteur que l'on notera X1X2 (Goupy et Creighton, 2006).

## **I.6.4. Les plans d'expériences :**

Plusieurs types de plans sont définis pour réaliser les expériences, il sont généralement répartis en plans factoriels complets et fractionnaires selon les exigences de l'expérimentateur.

### **I.6.4.1. Les plans factoriels complets :**

Lors des essais, les facteurs peuvent prendre deux ou trois niveaux. L'objet du plan complet est de tester toutes les combinaisons possibles aux limites du domaine d'étude : c'est le nombre maximal d'essais pour un plan d'expériences factoriel. Ils permettent de quantifier l'influence de facteurs sur une caractéristique. Cependant le nombre d'essais N peut vite devenir trop important lorsque le nombre de facteurs augmente. Ce nombre d'essai N se calcule en prenant en compte le nombre de facteurs et les niveaux associés à chacun d'eux. Prenons l'exemple de k facteur à deux niveaux le nombre d'essais N se calcule par la formule :  $N = 2^k$  (Goupy, 2001).

**I.6.4.2. Plans complets à deux facteurs ( $2^2$ ) (Goupy, 1997):**

- Le 2 en exposant signifie qu'il y a deux facteurs étudiés.
- L'autre 2 signifient que chaque facteur prend deux niveaux.

Cette notation se généralise pour un plan comportant l'étude de k facteurs prenant chacun deux niveaux, on écrira qu'il s'agit d'un plan  $2k$ .

**I.6.4.3. Modélisation mathématique :**

L'intérêt de modéliser la réponse par un polynôme est de pouvoir calculer ensuite toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligé de faire les expériences.

Le choix du modèle (premier ou second degré) dépendra des objectifs poursuivis, du nombre de facteurs considérés ainsi que du nombre de niveaux à tester par facteurs.

Dans le cas du plan d'expérience complet à deux niveaux et deux facteurs, le modèle mathématique postulé est un modèle du premier degré par rapport à chaque facteur (Goupy, 2000).

$$Y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_{12} x_1 x_2 \dots \dots \dots (1)$$

- $x_1, x_2$  : représentent le niveau attribué aux facteurs 1 et 2 respectivement.
- $a_0$  est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude.
- $a_1$  est l'effet du facteur 1.
- $a_2$  est l'effet du facteur 2.
- $a_{12}$  est l'interaction entre les facteurs 1 et 2.

**- La signification de  $a_0$** 

Si l'on donne à  $x_1$  et à  $x_2$  la valeur zéro, on définit le centre du domaine d'étude. La relation (I) devient alors :  $Y = + a_0$

Le coefficient  $a_0$  est la valeur calculée de la réponse au centre du domaine d'étude (Goupy et Creighton, 2006).

- **La signification de  $a_1$**

Au niveau moyen du deuxième facteur, nous donnons la valeur zéro à  $x_2$ . La relation (1) devient donc :  $Y = a_0 + a_1 x_1$

Cette relation permet de tracer l'évolution de la réponse prédite dans un plan de coupe  $x_2=0$ .

L'effet du premier facteur apparaît comme la variation de la réponse entre le centre du domaine d'étude et le niveau haut de ce facteur (Goupy et Creighton, 2006).

- **La signification de  $a_{12}$**

L'interaction apparaît comme la demi-différence entre l'effet du premier facteur au niveau haut du deuxième facteur (effet noté (ef+)) et l'effet du premier facteur au niveau bas du deuxième (effet noté (ef -)). Elle traduit une variation de l'effet d'un facteur en fonction du niveau d'un autre facteur (Goupy et Creighton, 2006).

L'interaction entre les deux facteurs est une interaction d'ordre 2.

**I.6.4.3.1. Matrice d'expériences :**

La matrice d'expériences est le tableau qui récapitule l'ensemble des essais et il indique le nombre d'expériences à réaliser avec la façon de faire varier les facteurs et l'ordre dans lequel il faut réaliser les expériences. Ce tableau est donc composé des nombres (+1) et (-1) (Sido, 2000).

Plus généralement, la matrice d'expériences comporte k colonnes pour les facteurs principaux et  $2^k$  Lignes.

**Tableau I.8 : matrice d'expériences pour un plan factoriel complet ( $2^2$ )(Goupy, 1997, Sido,2000) :**

N° de l'essai	X1	X2	Réponse
1	-1	-1	$Y_1$
2	+1	-1	$Y_2$
3	-1	+1	$Y_3$
4	+1	+1	$Y_4$

En adoptant ces règles empiriques, la matrice des effets obtenue est nommée : «Matrice de Hadamard».

#### I.6.4.3.2. Calcul des effets :

**Tableau I.9 : formules donnant les effets du plan factoriel ( 2<sup>2</sup>) :**

a <sub>0</sub>	$\frac{1}{4} (y_1+y_2+y_3+y_4)$
a <sub>1</sub>	$\frac{1}{4} (-y_1+y_2-y_3+y_4)$
a <sub>2</sub>	$\frac{1}{4} (-y_1-y_2+y_3+y_4)$
a <sub>3</sub>	$\frac{1}{4} (-y_1+y_2-y_3+y_4)$
a <sub>12</sub>	$\frac{1}{4} (-y_1+y_2-y_3+y_4)$

#### I.6.4.3.3. Analyse de la variance et validation du modèle linéaire :

Il s'agit de vérifier si le modèle estimé explique correctement les variations de la réponse observée. Le modèle sera considéré comme adéquat (approprié) si pour une combinaison donnée, l'écart entre la réponse moyenne observée et la réponse moyenne prédite par le modèle est acceptable (Lagrade , 1983).

#### I.6.4.3.4. Analyse de la corrélation :

Le coefficient de corrélation R<sup>2</sup>, nous renseignera sur la validité du modèle. Plus ce coefficient est loin de l'unité plus il sera considéré médiocre, et donc le modèle qui le fournit est moins représentatif

$$R^2 = \frac{\text{somme des carrés de réponses calculées corrigées de la moyenne}}{\text{somme des carrés de réponses mesurées corrigées de la moyenne}}$$

R<sup>2</sup> est compris entre 0 et 1.

#### I.6.4.3.5. Le coefficient R ajusté :

$$R_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{(n - 1) (1 - R)}{(n - p)}$$

- **n** : le nombre d'expérience réalisées.
- **P** : le nombre de coefficients du modèle.

#### **I.6.4.3.6. Seuil de confiance :**

Les résultats qui seront fournis après application de la régression linéaire seront justes à 95%, 0,05 étant le seuil de confiance généralement adopté en génie des procédés.

#### **I.6.4.3.7. Le t de Student :**

Pour évaluer l'importance d'un coefficient, la théorie des statistiques compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport  $a_1/\sigma$ . Ce rapport est appelé le t de Student.

A partir de t-Student, on peut évaluer la probabilité que le coefficient soit sans importance ou peu significatif. Si cette probabilité (la p-value) est proche de 0, le coefficient est influent, si la probabilité est proche de 1, le coefficient est négligeable. Si la p-value possède une valeur intermédiaire, le coefficient est peut être légèrement significatif.

#### **I.6.4.3.8. Test de Fisher :**

Le test de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce rapport permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. En d'autres termes, si le F de Fisher est élevé, les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs. Si le F de Fisher proche de 1, les variations des réponses mesurés sont comparables à celles des résidus.

La probabilité ou « valeur p » peut seulement prendre des valeurs comprises entre 0 et 1 ; si elle est inférieure à 0.05, on conclut que l'effet est significatif et si elle est inférieure à 0.01, il est possible de conclure que le facteur est hautement significatif.

#### **I.6.5. Logiciels de plans d'expériences :**

La construction des plans d'expériences est souvent facile mais l'essentiel est que le plan soit adapté à l'étude et non pas l'inverse. Il y a donc des situations où il faut absolument tailler un plan sur mesure. Les logiciels de plans d'expériences possèdent des bibliothèques de plans classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers (Goupy,1997)

La plupart des logiciels qui traitent des plans d'expériences sont inclus dans des logiciels de statistiques. Cette introduction s'est faite petit à petit sous la pression de la demande. Les premiers logiciels de plans d'expériences étaient très pauvres et mal adaptés aux besoins des expérimentateurs. Depuis peu, un effort considérable a été entrepris par les informaticiens et les statisticiens pour que ces logiciels répondent mieux à l'esprit et aux besoins des expérimentateurs. Ces logiciels sont encore très marqués par leur origine statistique et peuvent rebuter certains utilisateurs. Mais on constate un progrès constant vers l'amélioration, c'est-à-dire vers une meilleure prise en compte des exigences des expérimentateurs. Néanmoins, ces logiciels nécessitent tous une bonne connaissance de la méthode des plans d'expériences et ne peuvent pas être utilisés sans une formation solide aux plans d'expériences (Sado, 2000).

Parmi les principaux logiciels de plans d'expérience on peut citer (Droesbeke,1997; Goupy, 2001):

- JMP
- Minitab
- Statistica
- Statgrafics
- Unscrambler
- Pirouette
- Modde

# **CHAPITRE II**

## **MATERIEL ET METHODES**

## **II.1. MATERIEL**

### **II.1.1. Matériel biologique :**

La souche utilisée dans notre étude est *Lactococcus lactis subsp lactis* (S16), provenant de la collection du laboratoire LSTE de l'ENP.

### **II.1.2. Milieu de culture :**

Le lactosérum prélevé à la laiterie de Boudouaou a servi comme milieu de culture pour la fermentation étudiée. C'est un lactosérum doux ayant subi une déprotéinisation avant le lancement de la fermentation.

### **II.1.3. Produits et matériel utilisés :**

Les produits et matériel utilisés sont cités en annexe.

## **II.2.METHODES D'ANALYSE**

### **II.2.1. Analyses effectuées sur lactosérum brut :**

Nous avons effectué des analyses préalables sur le lactosérum brut avant de passer à la valorisation (voir les annexes).

### **II.2.2. Valorisation :**

Afin d'avoir notre milieu de culture , le lactosérum est déprotéiné par précipitation et 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 bain marie. Après refroidissement, on filtre sur un papier filtre simple. L'opération est effectuée plusieurs fois jusqu'a 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 La stérilisation du lactosérum s'effectue dans un bain marie à 100 °C pendant 10 min (Moulin , 1976).

### II.2.2.1. La fermentation :

#### - Préparation de la préculture :

En premier lieu, la souche conservée au réfrigérateur à 4°C est revivifiée par repiquage sur du lait écrémé (10%) stérilisé. 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 dans un tube de 10 ml de lait suivi d'une incubation à 30°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 mésophiles ;
- Le tube est ensuite incubé à l'étuve à 30°C. Ce milieu va servir à inoculer le milieu de culture.

#### - Préparation et lancement de fermentation :

La fermentation se déroule dans des erlenmeyers d'une capacité de 1 litre contenant 600 ml de lactosérum déprotéiné en présence d'une très faible agitation et en absence d'aération. Après stabilisation de la température à 30 °C, le milieu de culture estensemencé par 1% du milieu de préculture. Les erlenmeyers sont ensuite incubés dans une étuve à 30°C.

### II.2.2.2. 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 :

$$X \text{ (g/l)} = 0,8861 \times \text{DO}$$

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.2.2.3. 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 (Serres et al, 1974).

#### - 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 N/9 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 :

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

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

Avec :

- $V_0$  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;

### II.3. Méthode du plan d'expériences:

Afin d'avoir un modèle mathématique qui permet de connaître les conditions opératoires permettant une bonne croissance bactérienne ainsi qu'une meilleure production, la méthodologie des plans d'expériences a été retenue en utilisant un plan factoriel complet à deux facteurs chacun à deux niveaux  $2^2$  avec deux répétitions du point au centre du domaine.

Les calculs sont effectués à l'aide du logiciel JMP 8.

Nous avons utilisé le même dispositif expérimental pour effectuer le plan d'expérience à part que dans cette partie, nous avons varié le pH au lieu de la température et nous avons travaillé avec des erlens de 250ml. Nous avons fixé la température à 30°C en l'incubant dans l'étuve et avons suivi le plan d'expérience pour faire varier les paramètres (le pH et la concentration d'extrait de levure).

Le modèle mathématique utilisé est un modèle de premier degré avec interaction (PDAI). Ainsi, si on considère que la réponse  $y$  mesurée est la vitesse d'acidification calculée au bout de 6 h de fermentation et  $x_1$ ,  $x_2$  sont les facteurs continus et contrôlés tel que :

- $x_1$  : Le pH.
- $x_2$  : La concentration d'extrait de levure.

On peut écrire l'équation suivante :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2$$

Avec :

- $y$  : La réponse ;
- $X_1$  : Le pH ;
- $X_2$  : La concentration d'extrait de levure ;
- $a_0$ : Moyenne des réponses au centre ;
- $a_i$  : Coefficient donnant l'effet du facteur  $x_i$  sur la réponse ;
- $a_{12}$  : Coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les paramètres  $x_1$  et  $x_2$  sur la réponse .

Tableau II.1 : facteurs et domaine d'étude

Les facteurs étudiés	Niveaux de variation des facteurs		
	Niveau bas (-1)	Centre (0)	Niveau haut (+1)
pH X <sub>1</sub>	4	7	10
C d'extrait de levure (%) X <sub>2</sub>	1	3	5

Tableau IV.3 : Matrice d'expérience

Essai n°	X1	X2	pH	EL	V(°D/h)
1	1	1	10	5	0,33
2	-1	1	4	5	4
3	1	-1	10	1	0,33
4	-1	-1	4	1	4,16
5	0	0	7	3	7,5
6	0	0	7	3	7,16

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **III.1. EVALUATION DU LACTOSERUM BRUT DE BOUDOUAOU**

Avant de commencer la valorisation, nous avons effectué quelques analyses préalables sur le lactosérum brut issu de l'unité de production de Boudouaou, afin d'évaluer la pollution pouvant être générée par notre effluent.

Les résultats des analyses sont représentés dans le tableau III.1

**Tableau III.1 : Résultats des analyses effectuées sur le lactosérum brut**

<b>Paramètres</b>	<b>Résultats</b>	<b>Normes de rejet</b>
<b>pH</b>	6,3	5,5 à 8,5
<b>DBO</b>	4742 mg/l	40
<b>DCO</b>	8930 mg d'O <sub>2</sub> /l	120
<b>DCO /DBO<sub>5</sub></b>	1,8	-
<b>Nitrites</b>	3.27 mg/l	-
<b>Nitrates</b>	6.88 mg/l	-
<b>Ammonium</b>	27,23mg/l	-
<b>Phosphore total</b>	9600 mg/l	-
<b>MES</b>	2320mg/l	30
<b>Turbidité</b>	6862 NTU	/
<b>Conductivité</b>	5700 µs/cm	/

Le **pH** évalue l'acidité ou la basicité d'un effluent. Une variation du pH peut induire des modifications d'équilibres physico-chimiques dans les milieux naturels (Matieu-André, 2000).

Selon les normes indiquées, le pH d'un effluent doit être compris entre 5,5 et 8,5 pour le rejeter dans le milieu naturel. On a effectué une mesure du pH le jour du prélèvement et la valeur trouvée est dans les normes. Cette valeur correspond au pH d'un lactosérum doux (Violeau, 2009).

La **DBO<sub>5</sub>** correspond à la demande biochimique en oxygène au bout de 5 jours et elle ne doit pas dépasser 40mg/l (**Tableau I.2**), ce qui n'est pas le cas pour notre effluent. La DBO<sub>5</sub> du lactosérum étudié est de 4742 mg/l, elle dépasse largement la norme ce qui traduit visiblement sa charge organique.

La demande chimique en oxygène (**DCO**) du lactosérum brut est de 8930 mg d'O<sub>2</sub>/l, ce qui est énorme comparant à celle fixée comme étant la valeur à ne pas dépasser dans le cas de rejet dans le milieu naturel. Ce qui montre le pouvoir polluant du lactosérum

A l'aide des deux précédents paramètres, on a calculé le coefficient de biodégradabilité **DCO/ DBO<sub>5</sub>** qui est de 1,8. Cette valeur est légèrement supérieure à celle donnée dans le **tableau I.1**. Ce résultat traduit la bonne aptitude à la dégradation biologique des composés chimiques contenus dans le lactosérum. Un stockage trop important, non aéré ni brassé, conduit à une forte acidification et à la génération d'odeurs trop importantes causant la modification du milieu naturel et l'asphyxie des poissons (Mathieu-André, 2000).

Par contre, on remarque une faible concentration en nitrites, nitrates et ammonium qui s'explique par le fait que le lactosérum n'est pas riche en protéines et vitamines, une majeure partie de protéines coagulent lors de la fabrication du fromage.

La présence de toutes les formes d'azotes (**nitrites, nitrates et ammonium**) est certainement due aux protéines et aux vitamines présentes dans le lactosérum, ces dernières contiennent des molécules d'azote qui, après leur oxydation se forme les différentes formes oxydées de l'azote selon le degré d'oxydation .

Bien que le lactosérum contient du **phosphore**, la valeur trouvée est très élevée.

D'après Matieu-André (2000) cet excès est dû à l'utilisation de l'acide phosphorique pour le lavage des bacs de stockage.

L'azote et le phosphore participent aux phénomènes d'eutrophisation des lacs et des cours d'eau et présentent un risque de pollution des nappes souterraines. A dose élevée, les nitrates constituent un risque pour la santé humaine.

- **Remarque :**

- Les teneurs en phosphore, en nitrites, en nitrates ainsi qu'en ammonium ont été déterminées au laboratoire de la société des eaux et de l'assainissement de Kouba (S.E.E.A.L) et ce, en utilisant des méthodes colorimétriques.

Pour ce qui est des **MES**, on a eu des difficultés à les déterminer à cause des traces de protéines coagulées lors de la fabrication du fromage qui restent en suspension dans le lactosérum.

La valeur des MES trouvée dépasse la norme décrite dans le **tableau I.2**.

La **turbidité** du lactosérum est très élevée, elle est due certainement à la couleur du lactosérum.

Le rejet d'une grande quantité de lactosérum dans le milieu naturel peut causer des modifications dans la couleur des cours d'eau (rivières, lacs..etc.). De part sa couleur qui empêche la pénétration de la lumière dans l'eau, l'activité des êtres vivants aquatiques va être perturbée et un déséquilibre dans les cycles biogéochimiques.

La valeur importante de la **conductivité thermique** est due à la présence des minéraux ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , Na, K..etc.) (Violleau, 2009).

On remarque que les résultats que nous avons obtenus diffèrent de la composition du lactosérum doux du **tableau I.V**. Cela veut dire que même s'il s'agit de deux lactosérums doux, leurs compositions peuvent être différentes. Cette différence s'explique en premier lieu par les variations qualitatives des laits utilisés et en second lieu, par la diversité des technologies fromagères (Saulnier et al, 1995).

Ces résultats ne font que confirmer la richesse du lactosérum en éléments nutritifs et aussi expliquer la raison qui pousse plusieurs chercheurs à en faire le centre d'intérêt de plusieurs recherches, afin de le valoriser, profiter de sa richesse en nutriments qui fait de lui un excellent milieu de culture et de trouver une solution pour les problèmes environnementaux qu'il génère.

## **III.2. VALORISATION DU LACTOSERUM**

Dans cette partie, nous allons étudier une des voies de valorisation du lactosérum qui est la production de l'acide lactique, en utilisant une souche bactérienne choisie pour son pouvoir acidifiant au laboratoire de l'école nationale polytechnique. Pour cela, nous avons effectué des fermentations dans des Erlenmeyers de 600ml.

Afin de bien voir l'effet des paramètres extérieurs sur les résultats, nous avons travaillé dans différentes conditions opératoires, et cela en faisant varier la température et la concentration d'extrait de levure durant les fermentations effectuées .

### **III.2.1. Effet de la température :**

Nous avons effectué trois fermentations dans les conditions suivantes :

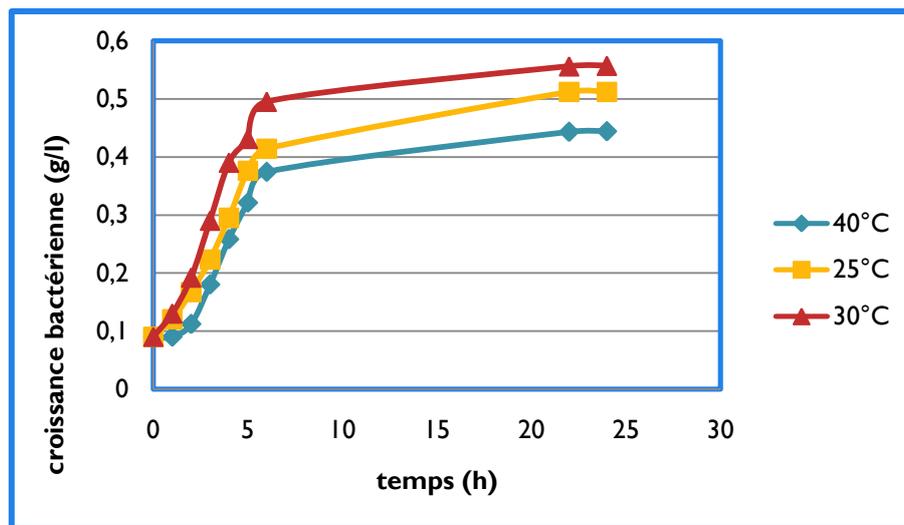
- Nous avons neutralisé le pH après déprotéinisation du lactosérum.
- Nous avons travaillé sans agitation à des températures différentes (30°C, 25°C et à 40°C) pour que nous puissions comparer et déterminer la température dans laquelle nous allons travailler.

Les figures ci-contre nous montrent les résultats des fermentations effectuées :

#### **III.2.1.1. La croissance bactérienne :**

Nous avons effectué des mesures de la croissance bactérienne en observant la variation de la DO en fonction du temps (à 600 nm ), qui est une méthode de mesure indirecte.

Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure III.1** .



**Figure III.1 : Evolution de la concentration de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes températures et à pH constant.**

D'après la **figure III.1**, on remarque que l'allure de l'évolution de biomasse obtenue durant les trois fermentations correspond bien à la courbe de croissance bactérienne :

A 25°C et 30°C, la phase de latence est absente puisque notre souche a été adaptée auparavant par une préculture sur du lait écrémé.

Par contre, à 40°C, on remarque une phase de latence qui dure une heure.

La croissance a commencé par une phase d'accélération rapide pour les fermentations à 25 et 30°C, elle ne dure que 2h et la reproduction cellulaire démarre rapidement.

Ensuite, dans l'intervalle [2h,6h], on observe la phase exponentielle de croissance correspondant à une grande évolution de la biomasse pour les fermentations à 30 et 25°C : phase où toutes les cellules se trouvent dans leur état physiologique optimal et peuvent se multiplier sans entraves. Le taux de croissance atteint sa valeur maximale  $\mu_{\max}$  (Sechet, 2000).

Selon l'équation  $\ln(x) = \ln(x_0) + \mu t \cdot \ln 2$ , on peut déduire graphiquement le taux de croissance des cellules pendant la phase exponentielle en traçant  $\ln(x) = f(t)$  et donc :

$$\mu_{\max} = (\ln(x) - \ln(x_0)) / ((t - t_0) \times \ln 2)$$

(Larpent et Larpent-Gourgaud, 1985).

Le taux de croissance maximal pour les fermentations à 25°C, 30°C et 40°C sont respectivement 0,32 h<sup>-1</sup>, 0,34 h<sup>-1</sup> et 0,29 h<sup>-1</sup>.

Ce qui signifie qu'on a une meilleure croissance à 30°C avec un taux de croissance maximal  $\mu_{\max} = 0,34 \text{ h}^{-1}$ . Cette valeur est inférieure à la celle trouvée par Raynaud (2006) qui est 0,56 h<sup>-1</sup>. Ce dernier a travaillé avec la même espèce mais sur du lait écrémé, cela est dû forcément au fait que le lait écrémé est plus riche que le lactosérum en nutriments.

Azari (1999) a obtenu de meilleurs résultats en faisant une culture mixte de *Lactococcus lactis ssp lactis* et *Lactococcus lactis ssp cremoris*

En comparant avec d'autres travaux réalisés avec des espèces différentes, à titre d'exemple : Ferdassou (2009) qui a travaillé avec *Streptococcus thermophilus*, a trouvé un taux de croissance comparable au notre qui est égale à 0,317 h<sup>-1</sup>, Aliane (2001) avec une autre espèce de *Streptococcus thermophilus* a trouvé 0,41 h<sup>-1</sup>.

Par contre, Boudjema(2006) a trouvé un taux de croissance de 0,157 h<sup>-1</sup>. De ce fait, on constate que les deux espèces ont presque la même aptitude à se développer dans du lactosérum.

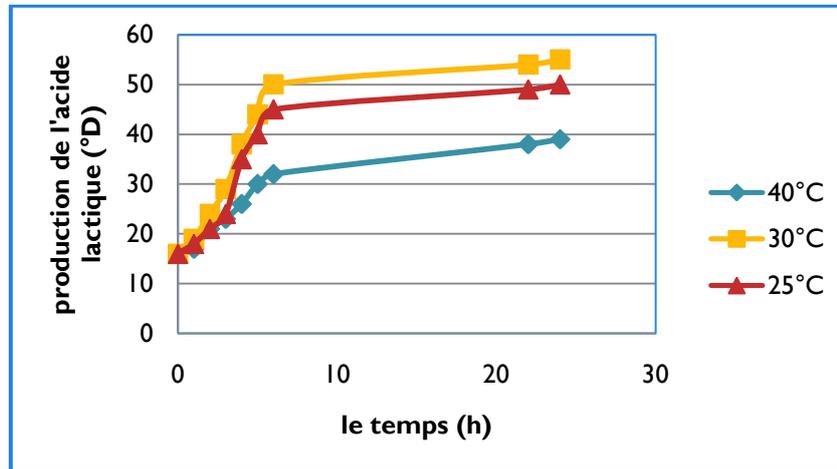
Une phase de ralentissement commence après 6 heures de fermentation. Durant cette phase,  $\mu$  décroît. Ce qui montre que le substrat (lactose) a diminué dans le milieu. Le palier peut être expliqué soit par l'apparition d'une carence nutritionnelle au cours de la culture (Raynaud, 2006) ou bien par une accumulation du lactate expulsé hors de la cellule. L'accumulation de ce lactate provoque une inhibition de la croissance bactérienne, qui s'arrête de façon précoce bien avant l'épuisement des substrats. Cette inhibition est liée, à la fois, à l'accumulation de l'acide lactique et à la diminution du pH du milieu intracellulaire qui en résulte (Béal et Sodini, 2007).

A l'aide de ces fermentations, on a constaté que la croissance est meilleure à 30°C, elle atteint 0,557g de matière sèche/litre de milieu de culture au bout de 24h comparée celle à 25°C et 40°C qui atteint respectivement une concentration de 0,512 et 0,444 g/l. La croissance diminue lorsqu'on augmente ou on diminue la température de 30°C; cela s'explique par le fait que *Lactococcus lactis* possède un optimum de croissance de 30°C (Jomaa, 2007).

### III.2.1.2. Production de l'acide lactique :

En parallèle avec la croissance bactérienne, nous avons suivi l'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du temps.

Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure III.2** :



**Figure III.2 : Evolution de la concentration de l'acide lactique en fonction du temps à différentes températures et à pH constant**

Bien que la cinétique de croissance et d'acidification soient différentes, il est intéressant de remarquer que l'évolution de l'acide lactique suit le même profil que la croissance bactérienne.

En outre, on remarque que l'évolution de la production est la même pour les trois températures, sauf que nous avons une meilleure production à  $T^{\circ} = 30^{\circ}\text{C}$ .

En effet, dans les systèmes biologiques, la température affecte le taux de réactions biochimiques et l'activité des enzymes extracellulaires, ce qui influe considérablement sur la production de l'acide lactique (Tehobanglous, 1979).

La production de l'acide lactique est ralentie lorsque les microorganismes ne sont pas dans leur température optimale de croissance.

Selon Tango et Ghaly (1999), Le taux de réaction biochimique de n'importe quel microorganisme augmente avec l'augmentation de température jusqu'à l'arrivée à une

température qui est considérée comme optimale, au delà de cette température, on remarque un ralentissement de production .

On remarque aussi une évolution rapide de la production durant les six premières heures : au début, elle croît lentement pendant la phase d'accélération pour ensuite commencer à monter rapidement à partir de 2h de fermentation. Enfin, nous observons une stabilisation de la production qui signifie que les bactéries ont arrêté de produire de l'acide, soit parce que le pH du milieu de culture est devenu trop acide et les bactéries sont inhibées ou alors tout simplement, les bactéries sont arrivées à leur phase de déclin et ont consommé tout le substrat .

Après 24h de fermentation à 30°C, la concentration d'acide lactique est passée de 15°D à 46°D. Cela signifie que *Lactococcus lactis* a dégradé le lactose contenu dans le lactosérum (Leveau et Bouix, 2001 ) et cela avec une vitesse d'acidification égale à 2,5°D pour 6h de fermentation.

Boudjema (2006) qui a travaillé sur l'optimisation de la production de l'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus* a remarqué une variation de 65,5°D après 8h de fermentation, le temps pendant lequel il y a eu une plus grande activité, cela veut dire que l'acide lactique est produit avec une vitesse de 8,17°D/h, ce qui est supérieur comparés aux résultats que nous avons obtenus.

Une concentration de 90,6°D a été trouvée après 12h de fermentation par Aliane (2001) qui a aussi travaillé avec *Streptococcus thermophilus*. De ce fait, on constate que *Streptococcus* est plus acidifiante que *Lactococcus lactis*.

Par contre, Fersadou(2009) a trouvé une vitesse de production d'acide lactique de 0,58°D/h au bout de 25h de fermentation avec *Streptococcus thermophilus*, cela est dû certainement à la différence de la nature des lactosérums utilisés pour les fermentations effectuées; ceci prouve que la production ne dépend pas seulement de la température et le type de la souche utilisée, mais aussi de la composition du milieu de culture.

Les résultats confirment que la température influe sur la croissance bactérienne ainsi que sur la production de l'acide lactique.

### III.2.2. Effet de l'extrait de levure :

L'extrait de levure est très riche en nutriments nécessaires pour la croissance bactérienne (acide aminés, vitamines), il constitue une source de vitamines et de facteurs de croissance (Adamberg et al., 2003).

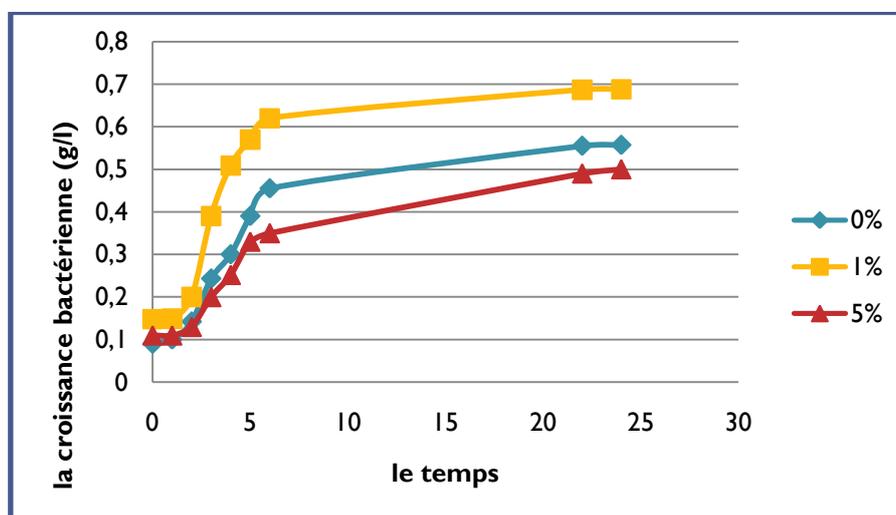
Afin de voir l'effet de l'extrait de levure sur la croissance bactérienne ainsi que sur la production de l'acide lactique et pour déterminer la meilleure concentration d'extrait de levure pour avoir des résultats plus performants, nous avons préparé deux milieux de culture à pH =7 dans lesquelles nous avons introduit respectivement 1% et 5% d'extrait de levure.

Nous avons suivi la cinétique de croissance ainsi que celle de la production de l'acide lactique pour bien voir l'effet d'adjonction de l'extrait de levure.

#### III.2.2.1. Croissance bactérienne :

Nous avons mesuré la croissance bactérienne avec la même méthode utilisée dans III.1.

Les résultats de la cinétique sont représentés dans la figure III.3.



**Figure III.3 :** Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps à différentes concentration d'extrait de levure.

Comme nous montre la **figure III.3**, l'allure des deux courbes qui correspondent au lactosérum déprotéiné supplémenté d'extrait de levure a le même profil avec celle obtenue sur le lactosérum déprotéiné, sauf que celle à 1% d'extrait de levure présente une meilleure croissance.

La croissance bactérienne s'améliore par rapport à celle observée à 0%, ceci s'explique par le fait que les bactéries ont ce qu'il leur faut comme nutriments en ajoutant 1% d'extrait de levure. Autrement dit, 10g/l de lactosérum est la quantité idéale à ajouter pour améliorer la croissance.

Selon Bury et al (2001), l'addition d'extrait de levure au lactosérum déprotéiné peut considérablement augmenter la croissance bactérienne, ceci se traduit par la disponibilité d'acides aminés libres, de peptides, purines de pyrimidine et de cofacteurs...etc (Zhang et al. ,2007).

Par contre elle peut être la cause de sa diminution comme nous le voyons dans la **figure III.3**, pour 5% d'extrait de levure, la croissance a diminué. De ce fait, on constate que l'extrait de levure améliore la croissance, mais en cas d'excès, il peut la ralentir.

Selon Boudjema (2006), Ce ralentissement peut être attribué à une inhibition par un excès de supplément (extrait de levure), ce dernier a aussi trouvé que 10g/l d'extrait de levure est la meilleure concentration pour une bonne croissance.

Fersadou(2009) confirme que 10g/l est bien la concentration que nous devons ajouter au lactosérum pour une amélioration.

Amrane (2000) qui a travaillé sur la production d'acide lactique par *Lactobacillus helveticus* cultivée sur lactosérum supplémenté par extrait de levure a conclu que les concentrations d'extrait de levure supérieures à 20 g/l deviennent toxiques pour le microorganisme.

Pour ce qui est des phases de croissance bactérienne, nous remarquons :

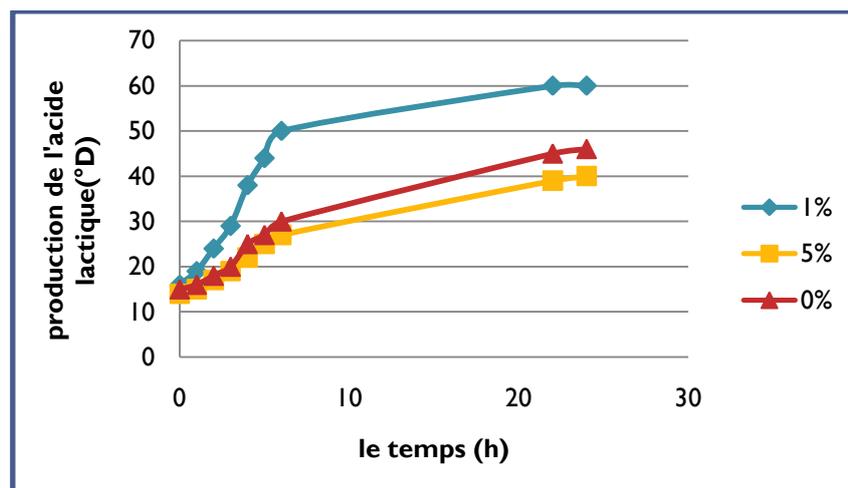
- l'existence d'une phase de latence pour les fermentations où il y a une adjonction d'extrait de levure, elle dure 1h pour la fermentation de 1% d'extrait de levure et 2h pour celle à 5%, ce qui se traduit par l'adaptation des bactéries à l'extrait de levure contrairement à ce qui a été trouvé pour le lactosérum déprotéiné.

- Une phase d'accélération d'une heure pour la fermentation à raison de 10g/l d'extrait de levure, tandis que pour celle à 5%, elle dure 3h, et ce entre la 2<sup>ième</sup> et la 4<sup>ième</sup> heure de fermentation.
- La phase exponentielle commence à partir de 2h de fermentation pour 1% d'extrait de levure avec un taux de croissance maximal  $\mu_{\max} = 0,4h^{-1}$  qui est visiblement supérieur à celui trouvé pour l'essai sans supplément. Pour ce qui est de la fermentation à 5% d'extrait de levure, la phase exponentielle est comprise entre [3h et 6h] avec un taux de croissance  $\mu_{\max} = 0,3h^{-1}$  ; ces résultats montrent bien que l'excès d'extrait de levure a un effet négatif sur la croissance bactérienne.
- Une phase de ralentissement après 6h de fermentation pour les 3 cas étudiés qui fini par une stabilisation au bout de 24h de fermentation et comme nous l'avons mentionné précédemment, nous n'avons pas pu savoir le moment exact de ralentissement et de stabilisation pour des contraintes opératoires.

### III.2.2.2. La production de l'acide lactique :

Outre la croissance bactérienne, nous avons aussi suivi la cinétique de production de l'acide lactique et ce, avec la méthode utilisée dans III.1.2

Nous avons représenté les résultats sur la **figure III.4**



**Figure III.4 : Evaluation de la production de l'acide lactique a différentes concentrations d'extrait de levure**

La figure montre une amélioration de la production de l'acide lactique après l'adjonction de 1% d'extrait de levure. En revanche, on remarque une baisse en ajoutant 5% , cela signifie que 1% d'extrait de levure est suffisant pour activer les bactéries à dégrader le lactose contenu dans le milieu de culture, par contre l'ajout excessif a causé le ralentissement de la production qui est probablement attribué à l'inhibition par excès de substrat.

Selon Amrane(2000), des concentrations élevées en extrait de levure peuvent devenir toxiques aux microorganismes influe négativement sur la production de l'acide lactique.

Levander et Radstron (2001) ont attribué l'inhibition de la production d'acide lactique à des concentrations d'extrait de levure au dessus de 10g/L.

Raynaud(2003) a souligné que l'extrait de levure a permis d'accroître la cinétique d'acidification mais il n'a eu aucun effet sur son amplitude. Ce qui n'est pas le cas pour nous, un accroissement de la vitesse de production a bien entendu été remarqué puisque la vitesse de production trouvée après l'adjonction de 1% d'extrait de levure est de 5,66°D/h, mais aussi on a remarqué une hausse de production, la concentration en acide lactique est passé de 16°D à 50°D au bout de 6h de fermentation alors que pour le lactosérum déprotéiné elle est passée de 15 à 30°D .

De ce fait, on a conclu que pour avoir une bonne croissance bactérienne ainsi qu'une production élevée d'acide lactique, on doit satisfaire les bactéries en nutriments dont elles ont besoin mais en respectant la quantité ajoutée, car un excès de supplément aura l'effet inverse.

**CHAPITRE IV**  
**PLAN D'EXPERIENCE**

Après l'étude que nous avons effectuée précédemment, nous avons vu que la production de l'acide lactique est confrontée à plusieurs facteurs qui peuvent avoir sur elle un effet positif ou négatif.

Nous avons suivi les étapes d'un plan d'expérience du type factoriel complet afin de modéliser la vitesse de production de l'acide lactique par *Lactococcus lactis* et d'étudier l'effet de deux facteurs qui ont un effet considérable sur cette dernière.

Evidemment, plusieurs facteurs peuvent avoir un effet sur la vitesse de production de l'acide lactique. Les facteurs sélectionnés pour la construction de notre plan sont :

- Le pH
- L'extrait de levure

Ces deux paramètres représentent nos variables d'entrée respectivement,  $X_1$  et  $X_2$ , et nous avons choisi comme réponse  $Y$  la vitesse de production de l'acide lactique après 6h de fermentation.

Les facteurs que nous avons fixés sont :

- $T=30^{\circ}\text{C}$
- Pas d'agitation

Pour valider notre modèle, nous avons ajouté 2 essais au centre du domaine d'étude (  $\text{pH}=7$  et 3% d'extrait de levure).

#### **IV.1. Définition des niveaux des facteurs :**

Il s'agit de choisir, en fonction de résultats de l'étude préliminaire et de la littérature, les niveaux hauts et bas des trois facteurs retenus et d'attribuer à chaque facteur sa valeur basse (-1) et sa valeur la plus haute (+1).

Les limites de variation des facteurs d'entrée sont présentées sur le tableau suivant :

Tableau IV.1 : Les niveaux de variation des facteurs

Les paramètres étudiés	Domaine d'étude (niveau de variation des facteurs)		
	Unités	Niveau bas (-1)	Niveau haut (+1)
pH (X1)		4	10
Extrait de levure (X2)	%	1	5

Pour un plan factoriel complet du type  $2^2$  ( $k=2$ ), le nombre d'essais qu'il faut réaliser est égal à 4, ces expériences sont organisées en appliquant l'algorithme d'Hadamard défini dans le chapitre I.

Notre réponse est donc sous la forme :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_{12}X_1X_2 \dots \dots \dots (\text{Eq IV.1})$$

Tel que :

- $Y$ : la réponse
- $X_1$  : valeur centrée réduite du pH ;
- $X_2$  : valeur centrée réduite de la concentration d'extrait de levure ;
- $a_0$ : moyenne des réponses au centre ;
- $a_i$  : coefficient donnant l'effet du facteur  $x_i$  sur la réponse ;
- $a_{12}$  : coefficient donnant l'effet de l'interaction entre les paramètres  $X_1$  et  $X_2$  sur la réponse

Le tableau IV.2 nous résume les expériences réalisées et la façon de faire varier les Facteurs.

**Tableau IV.2 : les différents essais pour l'établissement du plan d'expérience :**

N° essai	X1		X2	
	En unité réelle	X1 (en VCR)	(en unité réelle) (%)	X2 (en VCR)
1	4	-1	1	-1
2	10	+1	1	-1
3	4	-1	5	+1
4	10	+1	5	+1

**VCR : Variable Centrée réduite.**

## **VI.2. Expression des résultats et interprétation:**

Nous avons effectué des fermentations dans des flacons de 250ml d'échantillon, nous avons travaillé sans agitation à  $T=30^{\circ}\text{C}$  puisque nous avons constaté au préalable que c'est la température la plus favorable pour le bon déroulement de la fermentation.

Les autres conditions opératoires sans représentées dans la matrice d'expérience.

Nous avons suivi la fermentation au cours des six premières heures.

Les essais sont menés conformément au plan d'expérience et les résultats sont consignés dans la matrice d'expérience, et pour valider le modèle nous ajoutons 2 essais au centre du domaine d'étude ( $\text{pH}=7$  et 3% d'extrait de levure).

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures suivantes :

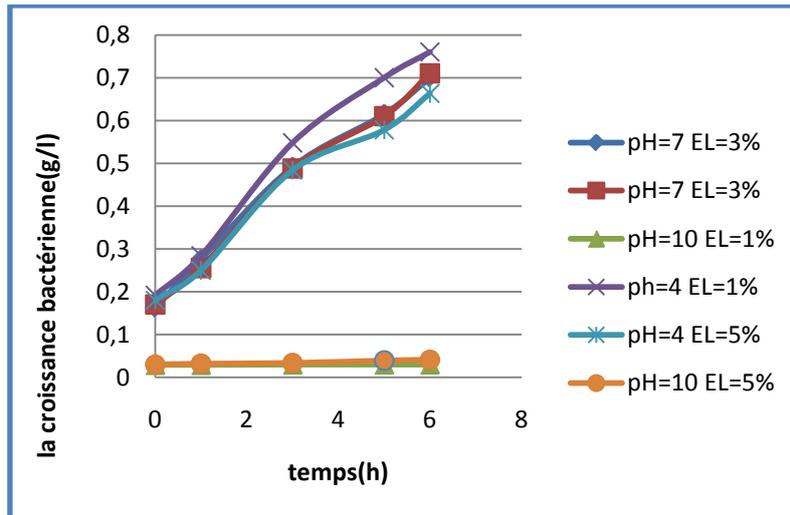


Figure IV.1 : Evolution de la croissance bactérienne en fonction du temps dans les conditions opératoire du plan d'expérience

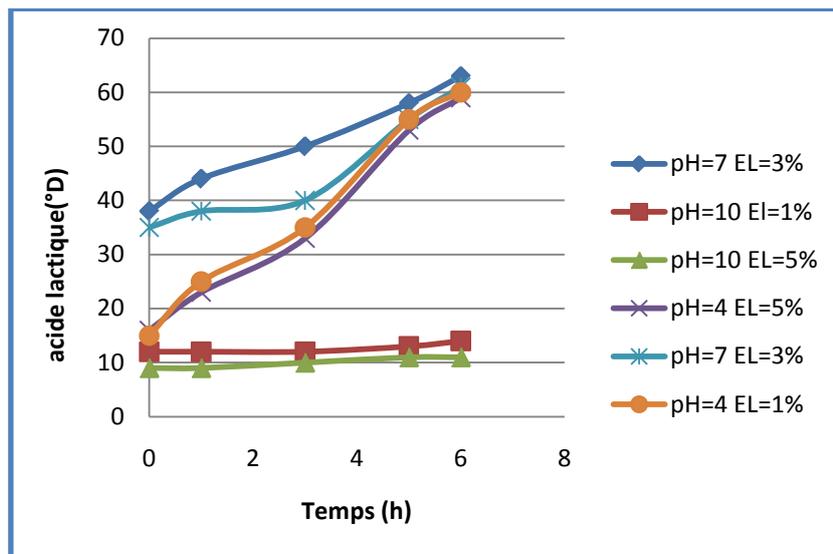


Figure IV.2 : Evolution de la production en fonction du temps dans les conditions opératoires du plan d'expérience

La **figure IV.1** représentant l'évolution de la croissance bactérienne en fonction du temps dans les conditions opératoires du plan nous permet de voir clairement que faire varier le pH et la concentration d'extrait de levure influe d'une manière considérable sur la croissance bactérienne.

A pH trop basique, la croissance bactérienne est presque nulle, cela se traduit probablement par le fait que les bactéries ne tolèrent pas un milieu très basique.

Par contre, on remarque une activité à pH=4 qui est acide, ce qui s'explique par le fait que les bactéries lactiques sont plus tolérantes dans un milieu acide.

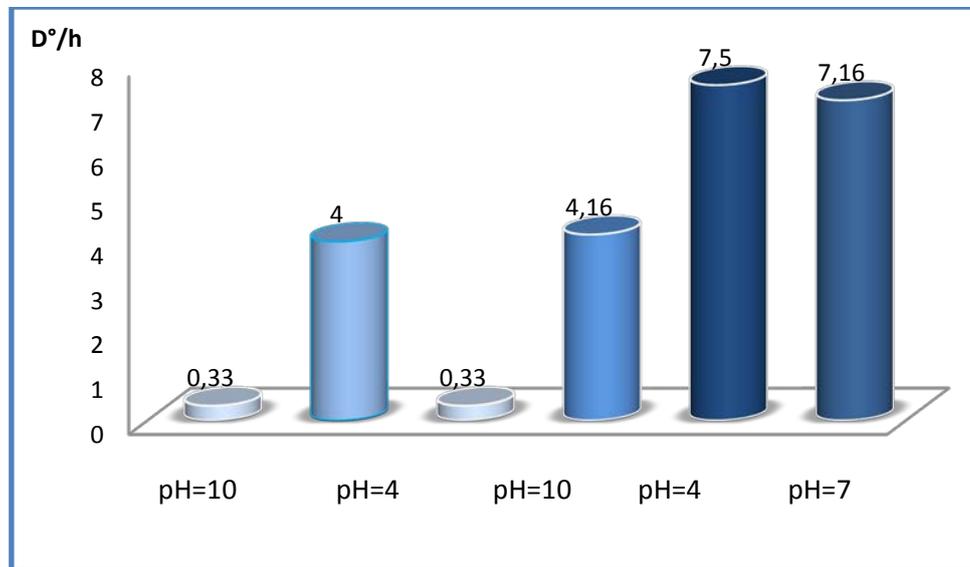
De plus, nous avons remarqué la même chose dans l'évolution de la production de l'acide lactique en fonction du temps (**Figure VI.2**), à un pH basique, la production de l'acide lactique est moindre voire nulle même avec l'adjonction de l'extrait de levure.

Les vitesses d'acidification après six heures de fermentation sont mentionnées dans la matrice d'expérience ci-dessous.

**Tableau IV.3 : Matrice d'expériences**

Essai n°	X1	X2	pH	EL	V(°D/h)
1	1	1	10	5	0,33
2	-1	1	4	5	4
3	1	-1	10	1	0,33
4	-1	-1	4	1	4,16
5	0	0	7	3	7,5
6	0	0	7	3	7,16

Afin de bien voir la variation de notre réponse en fonctions des conditions opératoires, nous l'avons représentée sous forme d'histogramme.



**Figure IV.3 : Variation de la réponse dans les conditions du plan d'expériences**

A partir de l'histogramme représentant la variation de la vitesse de production de l'acide lactique en fonction des différents paramètres du plan d'expériences, nous pouvons bien voir l'influence du pH et la concentration d'extrait de levure sur l'amplitude de cette dernière.

### IV.3. Modélisation :

#### IV.3.1. Analyse statistique :

Le logiciel **JMP 8.0** (version d'évaluation) utilise la probabilité (p-value) ( $P < 0,05$ ) pour évaluer l'analyse de la variance) afin de déterminer l'importance de chaque terme dans les équations du modèle et d'estimer la qualité de l'ajustement dans chaque cas.

A partir des résultats expérimentaux obtenus (**tableau IV.3**), nous avons calculé la valeur des coefficients de chaque facteur en utilisant le modèle mathématique (**Eq IV.1**), ces valeurs figurent sur le **tableau IV.4**.

Tableau IV.4 : les coefficients

	Coefficients ( $a_i$ )	Valeurs des $a_i$
La constante	$a_0$	7,33
Le pH	$a_1$	-7
L'extrait de levure	$a_2$	5,085
L'interaction des deux facteurs	$a_{12}$	-5,085

### IV.3.2. Evaluation des coefficients :

La signification de chaque coefficient dans l'équation a été déterminée par le test de Student et

P-value :

#### - Test du Student :

Pour évaluer l'importance de ces coefficients, on compare ce coefficient à son écart-type en faisant le rapport  $a_i / \sigma_{a_i}$ , ce rapport est appelé le t de student. En comparant  $t_i$  de chaque terme avec la valeur  $t_{crit}$  déterminé à partir de la table de student en fonction du degré du liberté ddl (n-p) et  $\alpha=0.05$ .

A partir de t student, on peut évaluer la probabilité (p- value) que le coefficient soit sans importance ou peu significatif et pour prendre une décision d'acceptation ou de rejet du coefficient, il suffit de comparer cette valeur au seuil  $\alpha$  tel que  $\alpha=0.05$ .

#### - Remarque

Pour chacune des réponses étudiées les coefficients du modèle calculés sont affichés dans le tableau.

Tableau IV.5 : Estimations des coefficients

Terme	Estimation	Ecart-type	Rapport t	Prob.> t
Constante	7,33	0,17	43,12	0,0148*
X <sub>1</sub> (4, 10)	-7	0,240416	-29,12	0,0219*
X <sub>2</sub> (0,01, 0,05)	5,085	0,240416	21,15	0,0301*
X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>	-5,085	0,240416	-21,15	0,0301*

Un astérisque est placé à côté des valeurs qui répondent à des testes significatifs.

D'après les résultats du tableau, on s'aperçoit que le facteur le plus influent est le pH puisque nous avons une très faible valeur de P-value. elle est égale à 0,0219.

Les résultats montrent aussi que l'extrait de levure ainsi que l'interaction des deux paramètres influent d'une manière considérable sur la réponse puisque leur P-value est aussi très faible.

Ces résultats nous permettent d'écrire le modèle donnant la réponse Y :

$$Y = 7,33 - 7 X_1 - 5,085 X_2 + 5,085 X_{12}$$

### IV.3.3. Validation du modèle :

Le modèle jugé doit franchir les tests de validations suivants :

#### - Les points au centre :

Le centre du domaine correspond à (x<sub>1</sub>=0, x<sub>2</sub>=0) exprimé en valeurs réelles par (pH=7 extrait de levure=3%).

Les réponses mesurées au centre du domaine (**tableau IV.2**) sont statistiquement égales à la réponse calculée (la constante a<sub>0</sub>) par ce modèle au même point du domaine.

#### - Le coefficient de détermination R<sup>2</sup> :

L'analyse des variances permet de calculer une statistique très utile : le (R<sup>2</sup>) et (R<sup>2</sup> ajusté). Les résultats obtenus à l'aide du logiciel JMP sont présentés sur le **tableau IV.6**.

Tableau IV.6: résumé de l'ajustement

<b>R carré</b>	0,998824
<b>R carré ajusté</b>	<b>0,995296</b>
<b>Écart-type résiduel</b>	<b>0,240416</b>
<b>Moyenne de la réponse</b>	<b>3,896</b>
<b>Observations (ou sommes pondérées)</b>	<b>5</b>

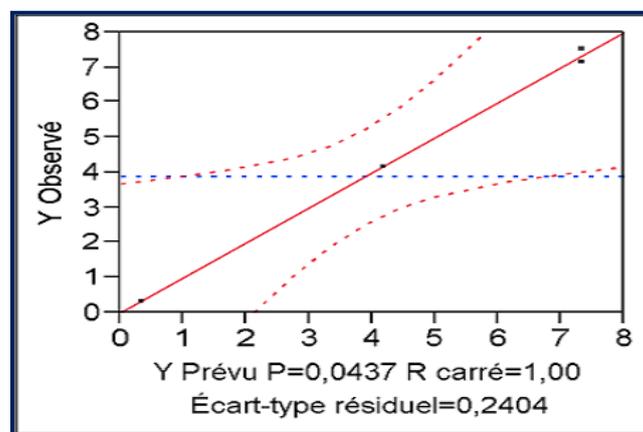


Figure IV.4 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues

On remarque que les valeurs du coefficient de détermination ( $R^2 = 0,998824$ ) et du coefficient de détermination ajusté ( $R^2_{aj} = 0,995296$ ) du modèle  $Y$  sont proches de 1 et généralement, un modèle de régression qui possède une valeur de  $R$  supérieure à 0,9 est considéré comme ayant une très forte corrélation. Ces deux paramètres indiquent la bonne qualité d'ajustement du modèle.

#### - Le test de Fisher :

Le tableau IV.7 résume l'analyse de la variance (test Fisher) pour la réponse  $Y$ . Le test de Fisher est le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus, il permet de calculer la probabilité de non égalité de ces deux carrés.

**Tableau IV.7 : Analyse de la variance**

source	Degré(s) de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
modèle	3	49,087120	16,3624	283,0860
résidus	1	0,057800	0,0578	Prob.>F
total	4	49,144920	/	0,0437*

Le test-F a indiqué que tous les facteurs et les interactions pris en compte dans la conception expérimentale sont statistiquement significatifs ( $P < 0,05$ ) et que les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs. En effet, la valeur faible de probabilité ( $< 0,0437$ ) indique que le modèle est significatif.

De ce fait, il apparaît bien que les termes du modèle Y sont significatifs, par conséquent, le modèle est validé.

En effet, les tests de validation témoignent amplement de la bonne qualité du modèle proposé qui est valide dans le domaine suivant :

**1% < Extrait de levure < 5%**

**4 < pH < 10**

#### **IV.4. Représentation graphique des effets :**

Le diagramme des effets (**Figure IV.5**) indique les effets principaux des facteurs. L'importance et le sens de la pente de chaque paramètre donnent une information sur l'influence de ce paramètre.

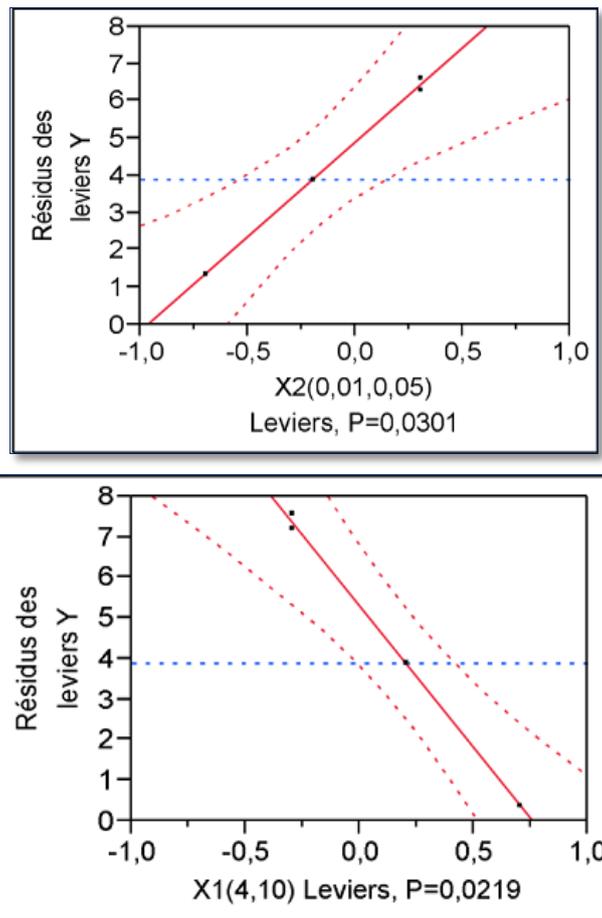


Figure IV.5 : Effet du pH et de l'extrait de levure

A partir des diagrammes représentés sur les figures (IV.5), nous constatons que :

- le facteur le plus influent est le pH avec un effet négatif (-7) ;
- L'effet de l'extrait de levure a un effet positif (5,85) sur la réponse ;

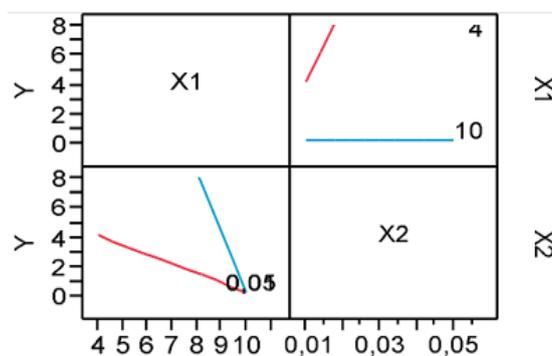


Figure IV.6 : Diagramme des interactions

Le diagramme des interactions indique l'effet d'un facteur au niveau bas et haut d'un autre facteur. L'étude de leur interaction (**figure IV.6**) permet de voir que les droites ne sont pas parallèles ce qui veut dire qu'il y a une interaction entre les facteurs.

Le carré supérieur droit indique l'effet de la concentration d'extrait de levure pour le niveau bas (4) et haut (10) du pH, et le carré inférieur gauche présentant l'effet du pH pour le niveau bas (1%) et haut (5%) de concentration d'extrait de levure.

L'interaction  $a_{12}$  est égale -5,085, ce qui signifie que l'effet de la concentration d'extrait de levure est plus faible quand le pH est élevé puisque les bactéries meurent à pH trop basique, donc l'extrait de levure n'a aucun effet.

En conclusion, les tests statistiques et les diagrammes permettent de considérer le modèle du premier degré comme un bon modèle pour représenter les résultats du plan d'expériences.

En appliquant les équations **(I.1)**, **(I.2)** et **(I.3)**, nous pouvons exprimer notre modèle en unités réelles :

$$Y = 7,33 - 7 * \left(\frac{X_1 - 7}{3}\right) - 5,085 * \left(\frac{X_2 - 0,03}{0,02}\right) + 5,085 * \left(\frac{X_1 - 7}{3}\right) * \left(\frac{X_2 - 0,03}{0,02}\right)$$

# CONCLUSION

Les problèmes environnementaux de l'industrie sont généralement dus à la pollution de l'eau, de l'air et du sol, au bruit et aux déchets. Dans la filière laitière, le principal problème se situe au niveau de l'eau. Les industries laitières n'ont aucune incidence particulière sur la pollution de l'air et des sols.

L'industrie fromagère étant un exemple des industries laitières compte parmi ces pollueurs, elle est à l'origine de la pollution des cours d'eau par le rejet de quantités très considérables de lactosérum qui est un sous produit très riche en matières organiques, facilement biodégradable et très fermentescible. Même s'il ne présente pas de toxicité, le rejeter dans le milieu naturel engendrera une importante pollution : odeurs désagréables, tendance d'acidification des cours d'eau...etc.

Afin de prévenir ce problème, la stratégie mise en place consiste à effectuer une récupération maximale du coproduit et le valoriser.

La valorisation par voie biologique en utilisant des souches bactériennes capables de métaboliser la matière organique présente dans le lactosérum et de la convertir en un sous-produit utile est l'un des moyens les plus efficaces qui peuvent réduire de manière importante cette charge polluante.

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 *Lactococcus lactis subsp lactis* (S16).

Dans la première partie de notre travail, nous avons évalué le degré de la pollution engendrée par le lactosérum issu de la laiterie de Boudoudou. Bien entendu, nous avons trouvé que c'était vraiment la source d'une énorme pollution, avec une DBO de 4742 mg/l et d'une DCO égale à 8900 mg d'O<sub>2</sub> /l, donc un coefficient de biodégradabilité égale à 1,8 confirmant son aptitude à se dégrader facilement. De ce fait nous avons bien constaté qu'une valorisation par des microorganismes semble une bonne manière de le valoriser puisqu'il constitue un très bon milieu de culture de par sa richesse en nutriments.

La seconde partie de notre travail a porté sur la valorisation. Nous avons suivi la cinétique de croissance bactérienne ainsi que d'acidification à différentes températures et concentrations d'extrait de levure afin de voir déjà s'il y a présence de croissance et de

production dans le lactosérum, et s'il y en a, dans quelles conditions faut-il opérer pour avoir de meilleurs résultats .

Nous avons trouvé que 30°C était la température idéale pour une meilleure croissance ainsi qu'une bonne production avec  $\mu_{\max} = 0,34\text{h}^{-1}$  et une vitesse d'acidification  $V = 4^\circ\text{D/h}$  et nous avons constaté que la température avait bien une influence sur les résultats.

L'adjonction de 1% d'extrait de levure au lactosérum déprotéiné a donné de meilleurs résultats, avec un taux de croissance  $\mu_{\max} = 0,4\text{h}^{-1}$  et une  $V = 5,66^\circ\text{D/h}$ , mais nous avons remarqué que l'ajout de 5% d'extrait de levure a causé une diminution du taux de croissance et production de l'acide lactique. Donc, avant de d'ajouter des suppléments, il faut faire des dosages afin de savoir quelles sont les concentrations optimales en nutriments nécessaires.

En dernier lieu, nous avons suivi un plan d'expérience pour établir un modèle mathématique. L'établissement d'un modèle mathématique nous a permis d'étudier l'effet du pH et l'extrait de levure en effectuant quelques expériences et aussi, d'avoir un modèle mathématique représentant la réponse en fonction des différents facteurs étudiés.

D'après les résultats obtenus, nous avons bien vu que le lactosérum pouvait être valorisé d'une manière très facile, ne nécessitant pas beaucoup de produits ni de matériels.

Pour de meilleurs résultats, nous pensons qu'il est préférable de :

- Travailler en continu pour éviter l'accumulation d'inhibiteurs produits par les cellules bactériennes ;
- Travailler avec un plan factoriel complet en étudiant plusieurs facteurs et niveaux pour avoir une meilleure modélisation ;
- travailler avec des cultures mixtes.

---

## *Références bibliographiques*

---

- 1) Adamberg, Y.K., Kask, S., Laht, T.M et Paalme, T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic bacteria. *International journal of food and microbiology*, (2003), 85, 171-183.
- 2) Alais, C. La valorisation du lactosérum " les bases et les problèmes". *La Technique laitière*, (1981), 952, 7-10.
- 3) Aliane, N. Optimisation des paramètres de fermentation pour la production de l'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* sur lactosérum : établissement d'un modèle mathématique. Thèse de magister. ENSA. El-Harrach, 2002.
- 4) Amrane, A. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. *Journal of chemical technology and biotechnology*, (2000), 75, 223-228.
- 5) Audic, J.L., Chaufer, B et Daufin, G. Non-food applications of milk components and dairy co-products. A review : INRA, EDP Sciences, (2003), 417-438.
- 6) Azari, B. Effet de la température sur la croissance bactérienne et la production de composés d'arômes dans du lait supplémenté de citrate par des bactéries lactiques mésophiles aromatisantes en culture mixte. Thèse de doctorat. Université de Moncton. Canada, 1999.
- 7) Béal, C et Sodini, I. Fabrication des yaourts et des laits fermentés. F6315. *Technique de l'ingénieur*, (2003), 16 p.
- 8) Berry, D. Ingredients foods. *Dairy foods*, (2000), 101(4), 32p.
- 9) Boudjema, K. Optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*. Thèse de magister. Université de Boumerdes. Boumerdes, 2008.
- 10) Branger, A. Fabrication de produits alimentaires par fermentation : les ferments. F3500. *Technique de l'ingénieur*, (2004), 16p.
- 11) Bremerhaven, T. étude de faisabilité de nouvelles techniques pour la valorisation des déchets dans le secteur agroalimentaire au Maghreb arabe, (2011), 1-33.

- 12) Bury, D., Geciova J et Jellen, P..Effect of yeast extract supplementation on  $\beta$  galactosidase activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*.11842 grown in whey.Journal of food science, (2001), 5, 166-170.
- 13) Corbiere, A. 1978. Possibilités d'utilisation des lactosérums de fromagerie. RIA,( 1978) ,260, 35-45.
- 14) Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curck, M.C., et Janssens, D.  
Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : les bactéries lactiques. T1. Ed Lorica, Lavoisier, Paris, (1994), 604p.
- 15) Dryer,J. La grande diversité du lactosérum. Dairy foods, (2001), 102(5), 1-35.
- 16) El khabbaz,E.H. traitement des solutions modèles du lait par des membranes de nanofiltration et d'osmose inverse. Thèse de doctorat. université mohammed V. Rabat, 2008.
- 17) FAO / OMS .Comité d'experts dur le code de principe concernant le lait et les produits laitiers, 7ème édition, 1977.
- 18) Fersadou H. Valorisation du Lactosérum par production de l'acide lactique par *Streptococcus thermophilus*. Mémoire de fin d'étude en génie de l'environnement. Ecole Nationale Polytechnique, El Herrach ,2009.
- 19) Goupy, J. Plans d'expériences. P230. Techniques de l'ingénieur, (1997), 26p
- 20) Goupy, J et Creighton,L. Introduction aux plans d'expériences, 3<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, 2006.
- 21) Goupy,J. Introduction aux plans d'expériences, seconde édition, Dunod, 2001, 303p.
- 22) Groupy, J. Modélisation par les plans d'expériences. R275. Techniques de l'ingénieur, (2000), 23.
- 23) Harang, F. Traitement et valorisation des effluents de l'industrie laitière, Application au contexte fermier. 2010.
- 24) Jaquet-Violeau ,V. Déminéralisation par électrodialyse en présence d'un complexant application au lactosérum. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique. Toulouse, 1999.
- 25) Jarry,A. Production industrielle d'acide lactique. bactéries lactiques .T1, Ed Lorica, Lavoisier, Paris, (1994), 604p.
- 26) Jomaa.A. Etude des propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *L actococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Thèse de doctorat .Institut nationale polytechnique. Lorraine, 2007.

- 27) Labioui, H., El Moualdi, L., El Yachioui, M., & Ouhsine, M . Sélection des souches de bactéries lactiques, Laboratoire de biotechnologie microbienne . Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,( 2005), 144, 237-250.
- 28) Lagrade, J. D. Initiation à l'analyse des données .Edition Dunod, Paris,1983, 456p.
- 29) Larpent, J.P et Larpent-Gougau, M. Eléments de microbiologie. Paris, Hermann, (1985), 463p.
- 30) Lepoudere, A., Snappe, J.J et Sredzinski.N. Protéines laitières. F4820. Techniques de l'ingénieur, (2010) ,19 p.
- 31) Levander, F and Radstron, P. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharid biosynthesis on glucose and lactose using *Streptococcus thermophilus*. Applied and environmental microbiology, 2001, 6, 2734-2738.
- 32) Leveau, J. Y et Bouix, M. Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier. Apria, 1993, .
- 33) Leveau, J-Y.,Bouix, M.,& Larpent, J-P.Sécurité microbiologique des procédés alimentaires, Technique de l'ingénieur, F1120, (2001).
- 34) Linden,G et Lorient,D. Biochimie agro-industrielle : valorisation alimentaire de la production agricole, Paris, (1994), 392p.
- 35) Luquet, F et Boudier , J.F. Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale. Apria, (1984), 21, 83-90.
- 36) Mathieu-André, C. Maîtrise de la consommation d'eau et des rejets des IAA. Technique de l'ingénieur, F1120, (2001).
- 37) Moletta, R., & Torrijo, M. Impact environnemental de la filière laitière, F1500. Techniques de l'ingénieur, (2001), 16 p.
- 38) Moulin, G., Galzy, P et Ratomahemina, R. Sélection des levures en vue de la culture sur lactosérum. Lait, 1976 , 553-554.
- 39) Petit-lait/Lactosérum. [www.swissmilk.ch/fr/uploads/media/molke\\_sirte\\_fr](http://www.swissmilk.ch/fr/uploads/media/molke_sirte_fr).
- 40) Pierre, A et Fauquant, J. Principes pour un procédé industriel de fractionnement des protéines du lactosérum. Le Lait, 1986, 66 (4), 405-419.
- 41) Pillet, M. Les plans d'expériences par la méthode de Taguchi, Les éditions d'organisation,2001 .
- 42) Protocoles de la société des eaux et de l'assainissement de Kouba (SEAAL).
- 43) Raynaud, S. Régulation métabolique et transcriptionnelle de L'autoacidification chez *Lactococcus lactis*, thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 2006.
- 44) Rodier, J., Col . L'analyse de l'eau. 8<sup>ème</sup> edition. Dunod, 2008 , 1384 p.

- 45) Sado,G. Les plans d'expériences : De l'expérimentation à l'assurance qualité, AFNOR. Bordas, 2000, 318p .
- 46) Sandra, Isabelle, Andrée, Simone, Pougheon. Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, 1974, Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE.
- 47) Saulnier,F., Ferrero,F., Bottera, J.Y et Linden,G. Variations de composition et nature de la fraction insoluble des lactosérums industriels, Laboratoire de biochimie . Lait, (1995),75, 93-100.
- 48) Sechet, P. La flore lactique: Microorganismes d'intérêt laitier. Enilia, (2000), 21-42.
- 49) Serres L., Amarigillos et Petransxiene D. Contrôle de la qualité des produits laitiers. Direction des services vétérinaires. Ministère de l'agriculture. France, 1974.
- 50) Sottiez , P. Produits dérivés des fabrications fromagères. lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre. Paris ,Ed Lavoisier,( 1990), 633p.
- 51) Tango, M.S.A and Ghaly ,A.E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using lactobacillus helveticus under batch conditions. Biomass and bioenergy, (1979),16:61-78.
- 52) Tchobanoglous, G. Waste water engineering: Treatment, disposal, Reuse. 2nd Ed, New York: Mc Graw-hi, , 1979.
- 53) Torrijos, M., Moletta, R. Traitement des effluents de la filière laitière, F1501, Techniques de l'ingénieur, 1999. 9p.
- 54) Veissyere, R. Technologie du lait. Paris, Masson Rustique,1975.
- 55) Vrignaud, V. Le lactosérum, une matière première noble pour les industries alimentaires humaines et animales. Revue laitière française, 1979, 372, 27-39.
- 56) Wehrmüller K., Agroscope Liebefeld. Posieux. Station fédérale de recherches en production animale et laitière, Travail de synthèse, 2009.
- 57) Woo , A. La grande diversité du lactosérum. Agriculture et agroalimentaire, Canada, 3-13.
- 58) Zhang, Z.Y., Jinn B et Kelly, J.M. Production of lactic acid from renewable materials by Rhizopus fungi. Biochemical engineering journal, 35, 251-263.

# **ANNEXES**

## 1. Réactifs:

### 1.1. Détermination de la DCO :

- Acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de concentration 4moles/l
- Acide sulfurique-sulfate d'argent
- Dichromate de potassium
- Sulfate de fer II et d'ammonium
- Hydrogénophénate de potassium
- Ferroïne (indicateur coloré)

### 1.2. Mesure des nitrate :

- Solution de salicylate de sodium
- Solution de tritrate double de sodium et de potassium
- Solution d'acide sulfurique
- Solution d'hydroxyde de sodium à 30%

### 1.3. Dosage des nitrites :

- Réactif coloré contenant :
  - Amino-4 benzène sulfonamide (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)
  - Acide orthophosphorique
  - Dichlorhydrate de N-(naphtyl-1) diamino-1,2 éthane (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-2HCL.

### 1.4. Dosage de l'ammonium :

- Dichloisocyanurate de sodium
- Réactif coloré contenant :
  - Salicylate de sodium
  - Citrate trisodique dihydrate
  - Nitroprusiate

### 1.5. Dosage du phosphore :

- Solution d'acide sulfurique 9mol/l
- Solution d'acide sulfurique 4.5 mol/l
- Solution d'acide ascorbique
- Solution de molybdate d'ammonium
- Solution d'hydroxyde de sodium à 8mol/l
- Acide nitrique d=1.40g/l
- Solution d'hydroxyde de sodium à 2mol/l

### **1.6.Déprotéinisation du lactosérum**

- Solution concentré d'acide sulfurique

### **1.7.Dosage de l'acide lactique**

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

## Annexe 2

---

### Matériel utilisé :

- Autoclave de marque CERTOCLAV .
- Etuve de marque MEMMERT
- Spectrophotomètre UV/visible de marque SHIMADZU
- Erlenmeyer de 1 litre
- des flacons de 250ml
- pH-mètre de marque HANNA
- Agitateur vortex de marque FISHER bioblock scientific
- Plaque chauffante munie d'un agitateur de marque STUART
- Bec bunsen
- balance analytique
- Verrerie courante de laboratoire
- DCO mètre
- Burette graduée de précision de capacité 25ml
- Erlen Mayer de capacité 75ml.
- Spectrophotomètre Hach DR-4000U
- Réfrigérant à reflux
- Creuset supportant des T° allant jusqu'à 550°C
- Dessicateur
- Four à moufle
- Conductimètre METTLER TOLEDO MC 226
- DBO mètre (respiromètre Oxitop )

### Evaluation du lactosérum Brut :

#### Détermination du pH :

La détermination du pH a été faite grâce à un pH-mètre par la méthode potentiométrique (Rodier,2008).

#### Mesure de la DCO:

##### - Principe

##### Ebullition à reflux, d'une prise d'essai :

- En présence de sulfate de mercure II ;
- En présence d'une quantité connue de dichromate de potassium et d'un catalyseur l'argent ;
- En milieu fortement acidifié par de l'acide sulfurique ;

pendant une période de temps donnée durant laquelle une partie du dichromate est réduite par les matières organiques présentes.

##### Titration de l'excès de dichromate avec une solution de sulfate de fer II et d'ammonium :

On en déduit la valeur de la DCO.

##### - Mode opératoire

##### Préparation de l'échantillon :

- Transférer 10 ml de l'échantillon dans les tubes de l'appareil à reflux et ajouter 5ml de la solution de dichromate de potassium et quelques régulateurs d'ébullition à la prise d'essai et agiter soigneusement.
- Ajouter, lentement et avec précaution, 15 ml d'acide sulfurique-sulfate d'argent en agitant soigneusement le contenu. Relier le réfrigérant aux tubes de l'appareil à reflux 2h00, la température du mélange réactionnel doit être de 150°C.
- Rincer le réfrigérant avec un petit volume d'eau distillée. Enlever alors le réfrigérant et compléter le contenu à 75 ml avec de l'eau distillée.

- Titrer ce contenu avec le sulfate de fer II et d'ammonium en présence de 2 ou 3 gouttes de l'indicateur coloré (feroïne).

Noter comme point de virage le changement brusque de couleur du bleu-vert au rouge-brun, même si le bleu vert réapparaît au bout de quelques minutes.

#### Essai à blanc :

Effectuer en parallèle un essai à blanc avec chaque série de déterminations en suivant le même mode opératoire mais en remplaçant l'échantillon de 10ml par de l'eau distillée.

#### Essai témoin :

Pour chaque série d'essais, vérifier la technique, de même que la pureté des réactifs par analyse de 10ml de la solution étalon en suivant le même protocole que pour la prise d'essai.

La DCO théorique de cette solution est de 500 mg/l, le protocole est satisfaisant si au moins 96% de cette valeur est obtenue (soit entre 480 et 520 mg/l).

#### **- Calcul de la DCO**

$$\frac{8000 * C * (V_2 - V_1)}{V_0}$$

#### Avec :

- C : Concentration de sulfate de fer II et d'ammonium exprimée en mole/l (environ 0.12 moles/l) ;
- V<sub>0</sub> : volume en millilitres de la prise d'essai, avant dilution éventuelle;
- V<sub>2</sub> : volume en millilitres de la solution de sulfate de fer d'ammonium utilisé pour l'essai à blanc ;
- V<sub>1</sub> : volume en millilitres de la solution de sulfate de fer et d'ammonium utilisé pour la détermination de l'échantillon ;
- 8000 : ½ molaire de l'oxygène par litre.

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'oxygène par litre (Norme ISO 6060)



## DCO mètre

### Détermination des matières en suspension (M.E.S)

#### - Principe

Nous avons utilisé la méthode de centrifugation pour séparer les matières en suspension et on a séché à 105°C.

#### - mode opératoire

- Attendre jusqu'à ce que les échantillons soient à température ambiante.
- Homogénéiser le contenu du flacon, en l'agitant.
- Si cela est possible, introduire la totalité de l'échantillon dans le pot de la centrifugeuse et centrifuger à 4000 tr/min durant environ 20min.
- Eliminer alors la phase claire et recueillir le dépôt (pour récupérer le reste du dépôt, utiliser un minimum d'eau distillée). Le volume de cet échantillon doit être tel qu'il conduise à la pesée d'au moins 30 mg de matières en suspension.
- Si le volume d'échantillon nécessaire à la mesure excède la capacité du pot, opérer plusieurs fois en récupérant à chaque fois le dépôt constitué, jusqu'à avoir centrifugé le volume requis.
- Sécher le creuset vide à 105°C, le passer au dessiccateur puis le peser (masse  $M_0$ ).
- Mettre le dépôt dans le creuset, sécher le tout à 105°C pendant 2h. passer au dessiccateur et peser à 0,500 mg près.

- Recommencer les opérations de dessiccation et de peser jusqu'à ce que la différence entre deux pesées successives n'excède pas 0,500 mg.

#### - Calcul de la teneur des MES

La teneur en matières en suspension est calculée d'après l'expression :

$$P = \frac{(M_1 - M_2) * 1000}{V}$$

avec :

- P : teneur en matières en suspension, en milligrammes par litre ;
- V : volume, en millilitre, de la prise d'essai ;
- M<sub>0</sub> : masse, en milligrammes, de la capsule vide ;
- M<sub>1</sub> : masse, en milligrammes, du creuset et de son contenu après séchage à 105°C et dessiccation (Norme ISO 11923)

#### Détermination des matières volatiles sèches (MVS) :

##### - Mode opératoire

- prendre les capsules ayant servi a la mesure des MES, avec le dépôt dedans, après séchage à 105°C et dessiccation (Masse M<sub>1</sub>) ;
- mettre la capsule dans un four à moufle à 550°C pendant 1heur ;
- Sortir la capsule du four et la laisser refroidir dans un dessiccateur ;
- Peser la capsule, jusqu'à poids constant (Masse M<sub>2</sub>).

##### - Calcul et expression des résultats :

Calcul de la matière minérale :

$$MM = \frac{(M_1 - M_2) * 1000}{V}$$

Avec :

- MM : Teneur en matière minérale, en mg/l.
- $M_1$  : la masse de la capsule pleine après séchage à 105°C et dessiccation en mg.
- $M_2$  : la masse de la capsule pleine après calcination à 550°C, en mg.
- V le volume d'eau traitée en millilitres.

Calcul des matières volatiles sèches :

$$MVS = M_2 - MM \text{ (mg/l)} \quad (\text{Rodier, 2008})$$

**Dosage des nitrites :**

**- Principe**

Réaction des ions nitrites présents dans une orise d'essai, à pH 1,9 avec le réactif amino-4 benzène sulfonamide en présence d'ortho phosphorique pour former un sel diazoïque qui forme un complexe de coloration rose avec le dichloro-hydrate de N-(naphtyl- 1)diamino-A,2 éthane (ajouter avec le réctif amino-4 benzène sulfonamide)mesurage de l'absorbance à 540nm.

**- Mode opératoire**

- Allumer l'appareil ;
- Appuyer sur "programme utilisé" ;
- Introduire le numéro du programme de  $\text{NO}_2^-$  ;
- Insérer la cuve avec le blanc (eau distillée), et appuyer sur zéro ;
- Remplir la cuve avec l'échantillon à analyser et appuyer sur lire ;
- La concentration des nitrites est affichée sur l'écran en mg/l.

Si la concentration dépasse 1mg/l, réaliser une dilution de manière à se ramener à une concentration comprise entre  $\mu 0,02$  et 1mg/l, refaire la mesure au spectrophotmètre et multiplier le résultat fois le facteur de dilution (Norme iso 6777).

**- Remarque**

l'étalonnage du spectrophotomètre se fait une fois par mois à l'aide des solutions étalon.

## **Dosage des nitrates**

### **- Principe**

- En présence de salicylate de sodium, les nitrates donnent du paranitrosalicylate de sodium, coloré en jaune et susceptible d'un dosage colorimétrique.

### **- Mode opératoire**

- Introduire 10ml d'échantillon à envoyer dans une capsule de 60 ml (pour des teneurs en nitrates supérieures à 5mg/l, opérer par une dilution ;
- Alcaliniser faiblement avec la solution d'hydroxyde de sodium ;
- Ajouter 1ml de salicylate de sodium puis évaporer au bain marie ou dans une étuve portée à 75°C-80°C (ne pas surchauffer, ni chauffer trop longtemps) ;
- Laisser refroidir ;
- Reprendre le résidu par 2ml d'acide sulfurique concentré ;
- Attendre 10 mn, ajouter 15 ml d'eau distillée puis 15 ml de la solution de tartrate double de sodium et de potassium qui développe la couleur jaune ;
- Effectuer les lectures au spectrophotomètre.

### **- Exploitation des résultats**

Les résultats sont donnés directement en mg/l de nitrate au lieu de milligramme par litre d'azote, ce qui fait que nous devons diviser sur la masse molaire de l'azote (Rodier, 2008).

## **Dosage du phosphore total :**

### **- Principe**

De nombreux composés organophosphorés sont transformés par minéralisation à l'aide d'acide nitrique et d'acide sulfurique puis réaction d'orthophosphates avec une solution acide contenant les ions molybdate et antimoine pour former un complexe d'antimonyl-phosphomolybdate, réduction de ce complexe par l'acide ascorbique pour former un complexe bleu de molybdène de couleur vive et mesurage de l'absorbance à 880 nm.

## **- Mode opératoire**

- A l'aide d'une pipette, introduire 40ml de l'échantillon dans un tube en verre (metras) à 100°C pour minéralisation ;
- Ajouter avec précaution 2ml d'acide sulfurique concentré et agiter puis ajouter des régulateurs d'ébullition et chauffer doucement jusqu'à l'apparition de fumées blanches ;
- Après refroidissement, ajouter goutte à goutte et avec précaution 0,5ml d'acide nitrique concentré, tout en agitant, après refroidissement, continuer de traiter si nécessaire en ajoutant de l'acide nitrique goutte à goutte tout en agitant, et ce jusqu'à obtention d'une solution limpide et incolore ;
  
- Refroidir et ajouter avec précaution 10ml d'eau distillée sous agitation continue et chauffer jusqu'à l'apparition d'une fumée blanche.
- Pendant que la solution refroidit, ajuster le pH à une valeur comprise entre 3 et 10 avec une solution de sodium à 8mol/l ;
- ajouter 1ml d'acide ascorbique puis au bout de 30 secondes, ajouter 2ml de molybdate d'ammonium et compléter à 50ml ;
  
- Effectuer la mesure avec le spectrophotomètre en appuyant sur P total (Norme ISO 6878-2004 (F))

## **Dosage de l'ammonium**

### **- Principe**

Mesure spectrophotométrique du composé bleu formé par réaction de l'ammonium avec les ions salycimate et hypochlorite sont générés in situ par hydrolyse alcaline du sel de sodium du dichloroisocyanurate de sodium.

### **- Dosage et mesure**

Prélever 40 ml d'échantillon à analyser, ajouter dans l'ordre :

- 4 ml du réactif coloré homogénéisé ;
- 4ml du réactif de dichloroisocyanurate de sodium, et homogénéiser.
- Après au moins 60 mn, attendre le développement de la couleur.

- Effectuer les mesures spectrophotométriques à la longueur d'onde de 655nm ( Norme ISO 7150/1)

## **Détermination de la conductivité**

### **- Principe :**

Détermination directe, à l'aide d'un instrument approprié des la conductivité électrique de solutions aqueuses. La conductivité électrique est une mesure du courant conduit par les ions présents et dépend de :

- De la concentration des ions ;
- De la natures des ions ;
- De la température de la solution ;
- De la viscosité de la solution.

### **- Mesure de la conductivité**

La mesure se fait directement en incorporant l'électrode servant à mesurer la conductivité dans l'échantillon.

Les résultats sont donnés en mS/m.

### **- Remarque :**

Les modes opératoires cités ci-dessus sont tirés catalogue des protocoles de la société des eaux et de l'assainissement de Kouba (SEAAL).

## **Mesure la DBO<sub>5</sub> :**

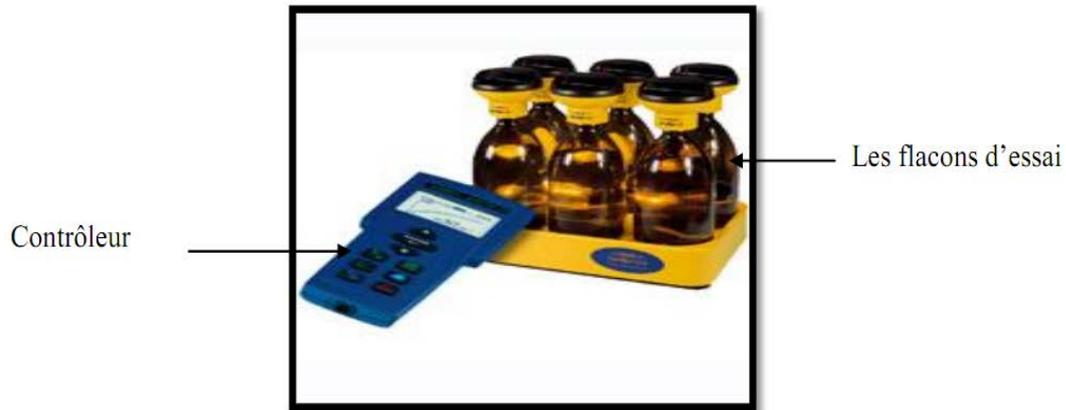
### **- Principe**

La méthode adoptée est une méthode manométrique utilisant un respiromètre Oxitop. Pour décomposer les substances organiques après la fermeture du système, les microorganismes consomment l'oxygène de la réserve d'air confinée. Le gaz carbonique qui se forme ainsi est absorbé par NaOH. Suite à la diminution de la quantité d'oxygène dans le flacon, la pression diminue, et cette diminution est détectée dans les têtes de mesure et enregistrée.

## - Mode Opérateur

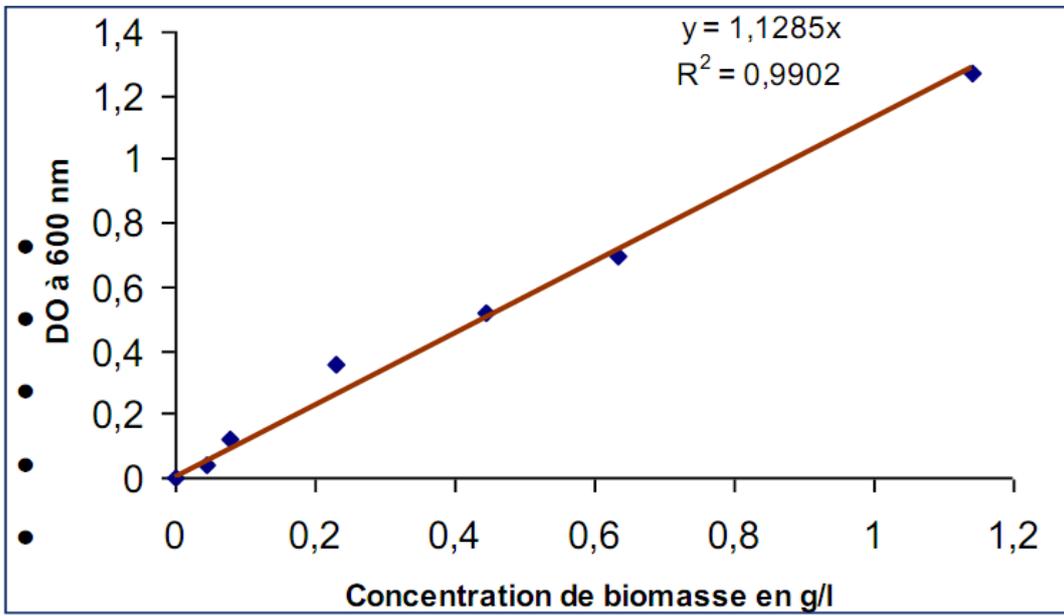
Les flacons contenant les échantillons sont remplis selon les données à l'affichage (quantité d'eau correspondant à la plage de mesure DBO).

Après 5 jours, la quantité d'oxygène consommée pour dégrader la matière organique, ainsi que celle consommée pour la respiration endogène des microorganismes contenus dans le lactosérum exprimée en  $\text{mg d'O}_2/\text{l}$  est directement lue (notice de l'appareil Oxitp).



**Figure II.1: respiromètre Oxitop**

**courbe d'étalonnage de la biomasse :**



**Tableau 1 :**

Tableau représentant les concentrations de la biomasse obtenues en ( mg/l) sur le lactosérum déprotéiné en variant la température :

Le temps	T°=25°C	T=30°C	T=40°C
0	0,09	0,09	0,09
1	0,12	0,13	0,09
2	0,167	0,192	0,112
3	0,223	0,29	0,18
4	0,295	0,39	0,258
5	0,376	0,431	0,321
6	0,414	0,495	0,374
22	0,512	0,556	0,443
24	0,512	0,557	0,444

**Tableau 2 :**

Tableau représentant les concentrations de l'acide lactique en (°D/h) obtenues lors des fermentations effectuées sur lactosérum déprotéiné en variant la température :

Le temps	T°=25°C	T=30°C	T=40°C
	14	15	12
	16	17	12
	18	19	13
	23	28	15
	46	32	16
	30	35	20
	32	39	37
	38	45	31
	39	46	31

**Tableau 3 :**

Tableau représentant les concentrations de la biomasse obtenues (mg/l) sur le lactosérum déprotéiné supplémenté de différentes concentrations d'extrait de levure :

Les temps	0%	1%	5%
0	0,09	0,148	0,11
1	0,1	0,149	0,11
2	0,142	0,2	0,13
3	0,243	0,39	0,2
4	0,3	0,509	0,252
5	0,39	0,57	0,33
6	0,455	0,62	0,4
22	0,555	0,687	0,35
24	0,557	0,688	0,35

**Tableau 4 :**

Tableau représentant les concentrations de l'acide lactique (°D/h) obtenus après les fermentations effectuées sur lactosérum supplémenté de différentes concentrations d'extrait de levure :

Les temps	0%	1%	5%
<b>0</b>	15	16	14
<b>1</b>	16	19	15
<b>2</b>	18	24	17
<b>3</b>	20	29	19
<b>4</b>	25	38	22
<b>5</b>	27	44	25
<b>6</b>	30	50	27
<b>22</b>	45	60	39
<b>24</b>	46	60	40

**Tableau 5 :**

Tableau donnant les résultats de la croissance bactérienne obtenus en établissant le plan d'expérience :

Le temps	1% - 4	1% - 10	5% - 4	5% - 10	3%- 7	3% - 7
<b>0</b>	0,192	0,18	0,03	0,029	0,17	0,163
<b>1</b>	0,284	0,25	0,032	0,029	0,255	0,276
<b>3</b>	0,548	0,84	0,336	0,03	0,488	0,492
<b>5</b>	0,7	0,578	0,0392	0,03	0,61	0,615
<b>6</b>	0,76	0,663	0,04	0,03	0,71	0,7

**Tableau 6:**

Tableau donnant les résultats de la croissance bactérienne obtenus en établissant le plan d'expérience :

Le temps	1% - 4	1% - 10	5% - 4	5% - 10	3%- 7	3% - 7
0	38	12	9	16	35	15
1	44	12	9	23	38	25
3	50	12	10	33	45	46
5	58	13	11	53	55	55
6	63	14	12	59	61	60

**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

## ملخص :

الغرض من هذه الرسالة هو تقييم في البداية درجة التلوث من صناعة الألبان واقتراح طريقة تقييم لمصل اللبن الناتج من ORLAC Boudouaou بوسيلة بيولوجية التي تتمثل في انتاج حمض اللاكتيك عن طريق التخمر باستخدام *Lactococcus lactis ssp lactis* اللبنة وهي بكتيريا من نوع لاكتيكي ذات طبع ميوزفيلي المختارة لسلسلتها المحمضة.

أجرينا عدة عمليات تخمر التي درسنا من خلالها تأثير العوامل الخارجية (درجة الحرارة، وتركيز مستخلص الخميرة ودرجة الحموضة). استنتجنا أن درجة الحرارة الملائمة لنجاح التخمر هو 30 درجة مئوية مع  $\mu_{max}=0.34h^{-1}$  وسرعة  $V=4 D^{\circ}/h$ . أيضا، إضافة خلاصة الخميرة تسمح أن يكون لدينا ل نتائج أفضل ولكن شرط اتباع تركيز المواد المغذية التي نحتاج إلى إضافتها. أخيرا، أنشأنا نموذجا رياضيا يمثل سرعة الإنتاج وفقا لدرجة الحموضة وتركيز مستخلص الخميرة و ذلك بالاعتماد على تصميم تجريبي كامل مضروب.

كلمات المفاتيح: استغلال, مصال الحليب, لاكتوكوس لاكتيس, حمض اللبن.

## Résumé :

Le but de la présente thèse est d'évaluer, dans un premier temps, le degré de la pollution engendrée par l'industrie laitière puis de proposer une méthode de valorisation du lactosérum issu de l'O.R.L.A.C de Boudouaou par voie biologique et ce, en produisant de l'acide lactique par fermentation par *Lactococcus lactis ssp lactis*, une bactérie lactique mésophile sélectionnée pour son pouvoir acidifiant.

Nous avons effectué plusieurs fermentations grâce auxquelles nous avons étudié l'effet des paramètres extérieurs ( $T^{\circ}$ , concentration d'extrait de levure et le pH). Nous avons déduit que la température favorable pour le bon déroulement de la fermentation est  $30^{\circ}C$  avec un  $\mu_{max}=0,34h^{-1}$  et une vitesse d'acidification  $V=4 D^{\circ}/h$ . Aussi, l'adjonction de l'extrait de levure nous permet d'avoir de meilleurs résultats mais à condition de respecter la concentration des nutriments que nous devons ajouter.

Enfin, nous avons établi un modèle mathématique représentant la vitesse de production en fonction du pH et la concentration d'extrait de levure en se référant à un plan d'expérience factoriel complet.

**Mots clés :** lactosérum, valorisation, *Lactococcus lactis ssp lactis*, acide lactique.

## Abstract :

The purpose of this thesis is to assess, at first, the degree of pollution from the dairy industry and to propose a valorization method of the whey from ORLAC Boudouaou by biological means and this in producing a lactic acid by fermentation with *Lactococcus lactis ssp lactis*, a mesophilic lactic acid bacteria selected for their acidifying power. We conducted several fermentations with which we have studied the effect of external parameters (temperature, concentration of yeast extract and pH). We deduced that the favorable temperature for the success of the fermentation is  $30^{\circ}C$  with a  $\mu_{max} = 0.34h^{-1}$  and a speed  $V = 4 D^{\circ} / h$ . Also, the addition of yeast extract allows us to have better results but provided you follow the concentration of nutrients that we need to add. Finally, we established a mathematical model representing the speed of production a lactic acid depending on the pH and the concentration of yeast extract, referring to a full factorial experimental design

**Key words :** whey, valorization, *Lactococcus lactis ssp lactis*, lactic acid.