

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomique

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences de la Nature et de la Vie

Option : Alimentation Humaine et Qualité des produits

Thème :

**Essais d'optimisation de la Production d'acide lactique
sur lactosérum doux par la souche *Streptococcus
thermophilus* isolée du yaourt**

Présenté par :

M^{elle} :Gribissa Tinhinane

M^{elle} :Akliouat hakima

Soutenu devant le jury composé de :

Président : M^r Sebbane H.

Maitre assistants classe(A) à L'UMMTO

Promoteur : M^{me} Senoussi-Ghezali Ch.

Maitre assistants classe(A) à L'UMMTO

Examineur: M^{me} Zennia si ahmed S.

Maitre assistants classe(A) à L'UMMTO

Examineur: M^{me} Hellal Z.

Maitre assistants classe(A) à L'UMMTO

Année universitaire : 2014-2015

Remerciement

En terminant notre mémoire de fin d'étude, il nous est agréable d'adresser nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de lointain à l'élaboration de cet ouvrage.

Nous remercions en particulier notre promotrice Madame Senoussi pour avoir accepté de diriger ce travail.

Nous présentons aussi un remerciement à tous le personnel du laboratoire commun de microbiologie en particulier M^{me} Heddad pour son dévouement, ses précieux conseils, ses encouragements, sa disponibilité et sa gentillesse.

Nos vifs remerciements vont aussi particulièrement aux membres du jury pour nous avoir fait l'honneur d'examiner et juger notre travail.

Un grand remerciement aux enseignants de l'université Mouloud Mammeri Tizi -ouzou qui ont contribué à notre formation.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance au dirigeant de l'unité de production FERMIER pour nous avoir permis d'effectuer notre stage et un grand remerciement à tout le personnel pour leur grande gentillesse en particulier à Souad et, Raïssa pour leurs conseils et leurs encouragements.

Ce rapport n'aurait pas été possible sans le soutien quotidien et les encouragements de nos familles, nos amis(e) et nos proches, nous les remercions du fond du cœur.

Dédicace

*Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir
donné la persévérance et l'obstination de parcourir mon
chemin. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la
réussite.*

Je dédie ce modeste travail à : A mes parents.

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de
l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu
leur procure bonne santé et longue vie.

A ma promotrice : M^{am} Senoussi qui nous a beaucoup
soutenu tout au long de notre travail

À tous mes proches, à ma sœur Fériel et à mes frères,
à mes amies : Samia, Lynda, Wissem, Melissa et
particulièrement à ma chère binôme Hakima,

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour
que ce projet soit possible

Je vous dis merci.

Tinhinane

Dédicace

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné la persévérance et l'obstination de parcourir mon chemin. Merci de m'avoir éclairé le chemin de la réussite.

Je dédie ce modeste travail à : A mes parents.

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma promotrice : M^{am} Senoussi qui nous a beaucoup soutenu tout au long de notre travail

À tous mes proches, à ma sœur Lamia et à mon frère Rachid. à mes amies : Samia, Lynda , Wissem, Melissa, Hayet et particulièrement à ma chère binôme Tinhinane.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible

Je vous dis merci.

Hakima

Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Streptococcus thermophilus

1.1. Caractéristiques générales de <i>Streptococcus thermophilus</i>	2
1.1.1. Classification.....	2
1.1.1.1. Les bactéries lactiques.....	2
1.1.2. <i>Streptococcus thermophilus</i>	2
1.1.3 Caractéristiques de <i>Streptococcus thermophilus</i>	3
1.1.3.1. Caractéristiques morphologiques.....	3
1.1.3.2. Caractéristiques métaboliques.....	4
1.1.3.3. Autres caractéristiques.....	6
1.1.4. Utilisations industrielles de <i>Streptococcus thermophilus</i>	7

Lactosérum

1.2. Composition biochimique et valorisation du lactosérum.....	8
1.2.1. Généralités sur le lactosérum.....	8
1.2.1.1. Différents types de lactosérum.....	8
1.2.2. Composition biochimique du lactosérum.....	8
1.2.2.1. Eau.....	8
1.2.2.2. Lactose.....	8
1.2.2.3. Minéraux.....	10
1.2.2.4. Protéines.....	10
1.2.2.5. Matière grasse.....	10
1.2.3. Valorisation du lactosérum.....	11
1.2.3.1. Alimentation humaine.....	11
1.2.3.2. Alimentation animale.....	11
1.2.3.3. Substrat de fermentation.....	11

Acide lactique

1.3. Caractéristiques et production de l'acide lactique.....	13
1.3.1. Historique	13
1.3.2. Propriétés optiques et physicochimiques de l'acide lactique	13
1.3.3. Voies d'obtention de l'acide lactique	14
1.3.3.1. Voie chimique	14
1.3.3.2. Voie fermentaire.....	14
1.3.4. Utilisations de l'acide lactique	15
1.3.4.1. Applications alimentaires	16
1.3.4.2. Applications dans l'industrie pharmaceutique ou médicale.....	17
1.3.4.3. Application comme désinfectant et détergent	17
1.3.4.4. L'emploi comme plastifiant	17
1.3.4.5. Applications dans l'industrie du textile.....	17
1.3.4.6. Applications dans l'industrie cosmétique.....	17
1.3.4.7. Applications dans l'agriculture	18

Partie II : Matériel et Méthodes

2. Présentation de La Laiterie.....	19
2.1. Matériel et méthodes	20
2.1.1. Matériel	20
2.1.1.1. Matériel biologique	20
2.1.1.2. Produits et réactifs	20
2.1.1.3. Appareillage	20
2.1.2. Méthodes	21
2.1.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons	21
2.1.2.2. Analyses physico chimiques et microbiologiques	21
2.1.2.2.1. Analyses physico-chimiques	21
2.1.2.2.1.1. Détermination du pH	21
2.1.2.2.1.2. Détermination de l'acidité titrable et de l'acide lactique	21
2.1.2.2.1.3. Détermination de l'extrait sec total	22
2.1.2.2.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse (méthode de GERBER) ..	22
2.1.2.2.1.5. Détermination de la teneur en protéines(méthode de LOWRY <i>et al</i> .,	
1951).....	22
2.1.2.2.1.6. Dosage du lactose en utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).....	23

2.1.2.2.2 Méthodes microbiologiques	24
2.1.2.2.2.1. Isolement et identification de la souche <i>Streptococcus thermophilus</i> ...	24
2.1.2.2.2.1.1. Isolement de la souche	24
2.1.2.2.2.1.2. Identification de la souche.....	26
2.1.2.2.2.2. Conservation de la souche.....	26
2.1.2.2.2.3. Préparation du lactosérum.....	26
2.1.2.2.2.4. Réalisation des fermentations.....	26
2.1.2.2.2.4.1 Préparation des précultures	26
2.1.2.2.2.4.2. Fermentation	28
Partie III : Résultats et discussion	
3. Résultats et discussion.....	29
3. 1. La Composition physico-chimique du lactosérum.....	29
3.1.1. pH.....	30
3.1.2. Matière grasse	30
3.1.3. L'extrait sec total.....	30
3.1.4. Acidité titrable et teneurs en acide lactique.....	30
3.1.5. Lactose	31
3.1.6. Protéines	31
3.2. Résultats des analyses microbiologiques	32
3.2.1. Préparation du milieu de fermentation et isolement de la souche de <i>Streptococcus thermophilus</i>	32
3.3. Optimisation de la fermentation en Batch.....	34
3.3.1. Les paramètres physico-chimiques étudiés	34
3.3.1.1. Effet de la température	34
3.3.1.2.Effet du pH	38
3.3.1.3. Effet de variation de l'inoculum.....	42
Conclusion.....	46

Résumé

L'industrie fromagère génère d'importantes quantités de lactosérum qui ne sont pas valorisées.

Ce sous produit, de part sa grande richesse en nutriments de base offre de nombreuses possibilités technologiques selon les traitements auxquels il est soumis.

En effet, il peut servir en tant que matière première dans la fermentation pour la production de divers métabolites tel que l'acide lactique.

L'objectif de la présente étude a pour but l'utilisation du lactosérum comme substrat dans la fermentation pour la production d'acide lactique par une souche de *Streptococcus thermophilus* isolée du yaourt.

Les analyses physico-chimiques effectuées sur cette matière ont révélé la richesse du lactosérum en nutriment de base (lactose, matière grasse, protéine...etc) ce qui suscite l'intérêt de le valoriser.

Les essais de fermentation qui ont été menés afin d'optimiser les conditions de la culture ont mis en évidence la possibilité de cultiver la souche *S.thermophilus* sur ce substrat, avec un taux d'inoculation de 20%, à température de 42°C et à pH (6,5), nous avons obtenus (6,2 g/l) d'acide lactique.

Mots clés : Lactosérum, Acide lactique, valorisation, physico-chimique, fermentation, optimisation, *Streptococcus thermophilus*

Summary:

The cheese industry generates significant amounts of whey that are not valued. This by-product, because of its richness in basic nutrients offers many technological opportunities as treatment to which it is subjected.

Indeed, it can serve as raw material in fermentation for the production of various metabolites such as lactic acid.

The aim of the present study aimed to the use of whey as a substrate in the fermentation for producing lactic acid by a strain of *Streptococcus thermophilus* isolated from yoghurt.

The physicochemical analyzes of this material revealed the richness of the basic nutrient whey (lactose, fat, protein etc ...) which arouses the interest of the value.

Fermentation tests were conducted to optimize the culture conditions have highlighted the possibility of cultivating the *S. thermophilus* strain on the substrate with an inoculation rate of 20% at temperature 42°C and pH (6.5), we obtained (6.2 g / l) lactic acid.

Keywords: Whey, Lactic acid, valuation, physical-chemical, fermentation, optimization, *Streptococcus thermophilus*

Liste de figures :

Figure 01 : Cellules de *Streptococcus thermophilus* observées au microscope optique au grossissement Gx1000

Figure 02 : Métabolisme des sucres de *Streptococcus thermophilus* lactique

Figure 03 : Les deux isomères optiques de l'acide lactique

Figure 04 : Schéma récapitulatif des deux voies de production de l'acide lactique

Figure 05 : Les différentes applications de l'acide lactique

Figure 06 : Les dérivés laitiers produits au sein de l'unité LE FERMIER

Figure 07 : Courbe étalon pour le dosage des protéines seriques, en utilisant la BSA comme protéines étalon.

Figure 08 : Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (aussi appelé acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrobenzoïque)

Figure 09 : Courbe étalon pour le dosage du lactose en utilisant des solutions connues de glucose.

Figure 10 : Isolement de la souche *Streptococcus thermophilus*

Figure 11 : les étapes de préparation des précultures

Figure 12 : Contrôle microbiologique de l'efficacité du traitement de la tyndallisation du lactosérum.

Figure 13 : Contrôle de la pureté de la souche *Streptococcus thermophilus* isolée
Sur milieu M17

Figure14 : Observation microscopique des cellules de *Streptococcus thermophilus* Gx1000 après coloration de Gram

Figure15 : Aspect de la Culture bactérienne après 2 heures de fermentation à 37 et à 42°C

Figure 16: Evolution du pH en fonction du temps et à différentes température et à pH constant

Figure 17: Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps et à différentes température et à pH constant.

Figure 18: Evolution de la concentration de lactose en fonction du temps à différente température

Figure 19 : Evolution de la biomasse en fonction du temps à différente température et à Ph constant.

Figure 20 : Aspect de la culture bactérienne après 2 heures de fermentation à des pH différents (5,5 ; 6,0 ; 6,5).

Figure 21: Evolution du pH en fonction du temps à différents pH et à $T = 42^{\circ}\text{C}$

Figure 22 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différents pH et à $T = 42^{\circ}\text{C}$

Figure 23 : Evolution de la concentration en Lactose en fonction du temps à différents pH et à $T = 42^{\circ}\text{C}$

Figure 24 : Evolution de la concentration de la biomasse en fonction du temps à différents pH et à $T = 42^{\circ}\text{C}$

Figure 25 : Aspect de la culture bactérienne après 2 heures de fermentation à des taux d'inoculum différents

Figure 26 : Evolution du pH en fonction du temps à différents taux d'inoculation et à température de 42°C .

Figure 27: Evolution de la concentration en Acide lactique en fonction du temps et taux d'inoculum différents

Figure 28 : Evolution de la Concentration en lactose en fonction du temps à taux d'inoculum différents et à $T = 42^{\circ}\text{C}$

Figure 29 : Evolution de la Biomasse en fonction du temps et taux d'inoculum différents

Liste de Tableaux :

Tableau I : Composition moyenne du lactosérum doux et acide

Tableau II : Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum.

Tableau III : Conditions opératoires concernant l'optimisation de la température

Tableau IV: Conditions opératoires concernant l'optimisation du PH

Tableau V: Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration d'inoculum

Liste des abréviations

BL : Bactéries lactiques

S.T: *Streptococcus thermophilus*

GRAS: Generally Recongnized as Safe

Lac S: Lactose perméase

Ldh : Lactate déshydrogénase

PFL: Pyruvate formate

ALS: Al synthétase

β -Gal : β -galactosidase

Lac B: Lactobacillus Bulgaricus

Eps : Exo polysaccharides

β- LG : β- lactoglobulines

α-LA : α- lactalbumine

BSA : Albumine sérique bovine

Ig : I immunoglobuline

FDA : Food and Drung Administration

STLD : Société de transformation du lait et dérivés

TSE : Tréptone sel eau

DNS : Acide 3.5 dinitrosalycilique

Introduction général

Introduction

La transformation très ancienne de lait en fromage présente l'avantage d'obtenir ce produit dans une forme plus conservable et plus digestible, cependant, cette élaboration est handicapée par la perte d'une quantité importante d'éléments nutritionnels qui se retrouvent dans le sérum.

Ce dernier, connu sous l'appellation « Lactosérum », a été considéré à tort pendant longtemps comme étant un déchet de l'industrie laitière, par suite des connotations négatives liées à cette appellation, il a été le plus souvent rejeté dans les eaux d'évacuation des fromageries.

En Algérie, l'industrie fromagère rejette quotidiennement 6000 litres de lactosérum par jour, soit 4 à 12 kg pour 1 kg de fromage produit (Gana et Touzi , 2001). Devant l'importance des tonnages en sérum rejetés chaque année, sa richesse en nutriments de base en particulier le lactose, les protéines solubles, les vitamines hydrosolubles, la matière grasse ainsi que les éléments minéraux font de lui un facteur de pollution redoutable.

Des efforts particuliers dans la recherche ont été entrepris afin de trouver les meilleures voies de sa valorisation. Les résultats intéressants des essais effectués au niveau des laboratoires ont donné lieu à des applications industrielles et à la création d'unités chargées de la valorisation du lactosérum. Il est utilisé dans différents domaines tels que l'alimentation humaine, l'alimentation animale et éventuellement dans le domaine de la biotechnologie afin de produire des protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.), des enzymes, des vitamines, d'alcool, des acides organiques (acide citrique, acide lactique..).

La production de l'acide lactique par fermentation constitue une des voies les plus attractives. Cet acide trouve un large domaine d'applications (alimentation, industries textiles, cosmétiques et pharmaceutiques ...).

La présente étude trace pour objectif l'utilisation du lactosérum récupéré de la fabrication du fromage à pâte molle de l'unité « FERMIER » comme substrat pour la production de l'acide lactique par une souche de *Streptococcus thermophilus* isolée du yaourt ; elle s'articule sur trois parties :

- Isolement et identification de la souche de *Streptococcus thermophilus* ;
- Analyses physico-chimique sur du lactosérum brut avant et après stérilisation ;
- Essais d'optimisation des conditions de culture de la bactérie pour la production de l'acide lactique.

Partie I : Synthèse bibliographique

1.1. Caractéristiques générales de *Streptococcus thermophilus*

1.1.1 Classification

1.1.1.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont des microorganismes unicellulaires très répandus dans la nature. Elles regroupent des espèces bactériennes à Gram-positif, ces bactéries peuvent avoir des formes en bâtonnets ou en coques, elles sont immobiles et non sporulantes, à catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles (Dellaglio et *al.*, 1994 ; Hogg, 2005).

Les bactéries lactiques sont naturellement retrouvées chez l'homme, les animaux, les aliments fermentés et sont également retrouvées dans le sol, l'eau, les engrais et les eaux d'égout (Holzapfel et *al.*, 2001; Pascual et *al.*, 2006; Mota et *al.*, 2006).

La caractéristique métabolique principale des bactéries lactiques est la production d'acide lactique, cette capacité est associée à la production majeure d'énergie par fermentation des sucres, mais elle confère aussi à ces espèces leur intérêt principal pour la transformation et la conservation des aliments. Les bactéries lactiques peuvent avoir un métabolisme homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique), hétérofermentaire facultatif (production d'acide lactique et d'acide acétique) ou hétérofermentaire strict (production d'acide lactique, d'acide acétique ou d'éthanol et de CO₂) (Vandamme et *al.*, 1996).

1.1.2. *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus est décrite pour la première fois par Orla-Jensen en 1919, elle est la seule espèce de streptocoques utilisée en technologie alimentaire, particulièrement dans l'industrie laitière après *Lactococcus lactis* (Hols et *al.*, 2005) .

De nombreuses souches de *S. thermophilus* ont été utilisées dans les procédés agroalimentaires, cette espèce fait partie des exceptions puisqu'elle est considérée comme sécuritaire pour la santé (GRAS ; Generally Recognized As Safe) (Bolotin et *al.*, 2004).

Il a été démontré par certaines études que cette espèce n'a pas été impliquée jusqu'à présent dans des maladies infectieuses. Le séquençage complet des génomes de 4 souches de *S. thermophilus* et leur analyse révèle l'absence ou l'inactivation des gènes liés à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Sun et *al.*, 2011).

Certains auteurs ont classé le genre *Streptococcus* en (06) groupes :

- Streptocoques pyogènes.
- Streptocoques oraux.
- Streptocoques fécaux.
- Streptocoques lactiques ou lactocoques du groupe sérologique N, faiblement hémolytiques, mais jamais pathogène
- Streptocoques anaérobies stricts.
- Les autres Streptocoques de groupe sérologique inconnu, hétérogènes faiblement ou non hémolytiques, parmi les quels on trouve l'espèce non pathogène *Streptococcus thermophilus*.

Les groupes taxonomiques où appartient cette espèce sont comme suit :

Division	:	Firmicutes
Classe	:	Coccus
Ordre	:	Lactobacillales (Gram+)
Famille	:	Streptococcaceae
Genre	:	Streptococcus
Sous -Espèce	:	Salivarius
Espèce	:	<i>Streptococcus thermophilus</i>

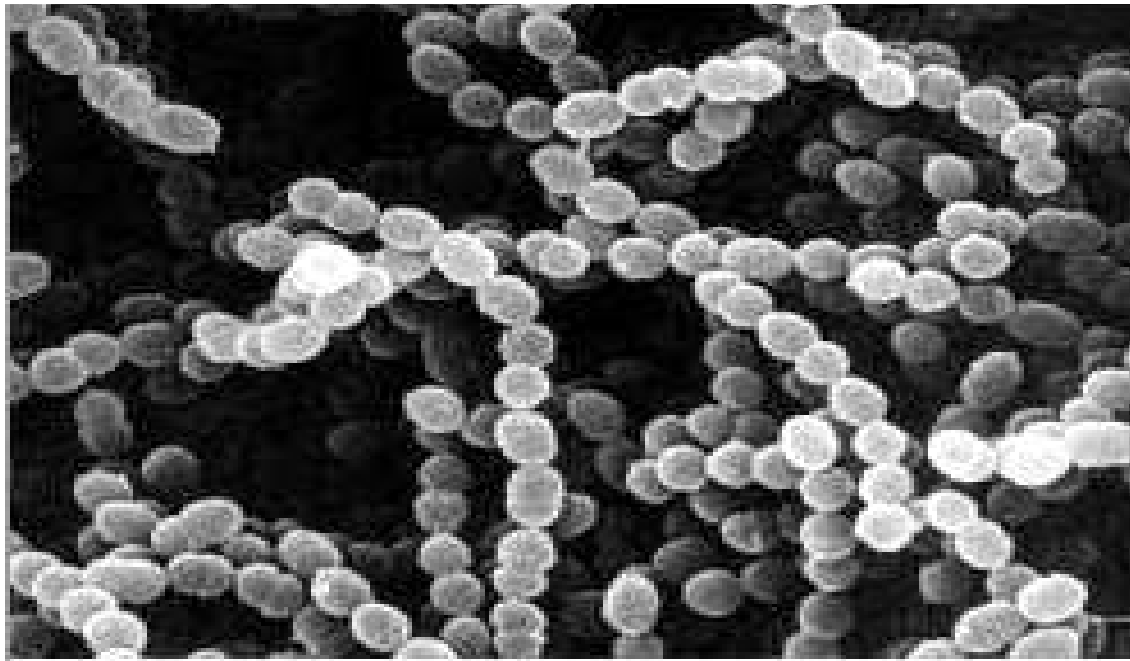
1.1.3. Caractéristiques de *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus est une bactérie alimentaire habituelle du milieu laitier animal ou maternel, trouvée dans le tractus gastro –intestinal très précocement chez les nourissants et sur les plantes en décomposition. (Solis et *al.*, 2010).

1.1.3.1. Caractéristiques morphologiques

Streptococcus thermophilus est une bactérie à gram-positif, anaérobie facultative, immobile et non-sporulantes.

Au microscope optique, *S. thermophilus* se présente sous forme de cellules sphériques ou Ovoïdes de diamètre allant de 0,7 à 1,0 μm , disposées en paire ou en longue chaîne (Figure 01) (Moineau, 1997).



**Figure 01 : Cellules de *Streptococcus Thermophilus* observées au microscope optique
Grossissement(x1000) (Moineau ,1997).**

1.1.3.2. Caractéristiques métaboliques

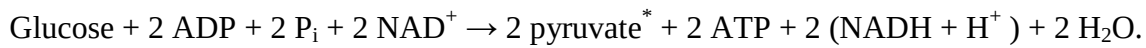
Streptococcus thermophilus fermente le lactose, son métabolisme est du type homofermentaire. Elle possède une β galactosidase active en présence de cations monovalents ou divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+}) (Desmazeaud, 1990 ; Lamoureux, 2000).

Streptococcus thermophilus produit de l'acide lactique à partir seulement de quelques sucres, à savoir, le fructose, le glucose, le mannose, le lactose et le saccharose (Schleifer et al.,1991 ; Panesar et al., 2007). C'est grâce à une enzyme membranaire, la lactose perméase (LacS), que le lactose est transmis à l'intérieur de la cellule bactérienne sous une forme libre ; L'hydrolyse du lactose (un diholoside) en glucose et en galactose est réalisée par une seconde enzyme la β galactosidase ou phospho β -galactosidase.

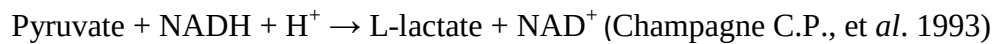
Le glucose entre dans la voie glycolytique, par contre le galactose est excrété dans le milieu extérieur vue que la plupart des souches *Streptococcus thermophilus* ne métabolisent pas ce sucre. (Champagne et al., 1993)

Chaque molécule de glucose provenant de l'hydrolyse du lactose, est ensuite métabolisée par la voie glycolytique, en deux molécules de pyruvate, 2 ATP et 2 H_2O :

Streptococcus thermophilus



En milieu anaérobie ou simplement pauvre en oxygène, une enzyme, la lactate déshydrogénase (Ldh), catalyse la transformation du pyruvate en L-lactate, tout en régénérant le NAD^+ :



Streptococcus thermophilus est donc une bactérie homolactique, produisant très majoritairement (à plus de 95 %) du L-lactate comme produit final du métabolisme des sucres, mais elle peut donner aussi dans des fermentations alternatives de l' α -acétolactate, de l'acétoïne, de l'acétaldéhyde, du formate et de l'acétate.

Seulement trois enzymes de dissipation du pyruvate ont été trouvées chez *S. thermophilus* :

- La lactate déshydrogénase (Ldh) conduisant à la production de lactate ;
- La pyruvate formate lyase (Pfl) ouvre des voies conduisant à la formation de formate et d'acétate ;
- L' α -AL synthétase (Als) est la voie de production de l'acétoïne.

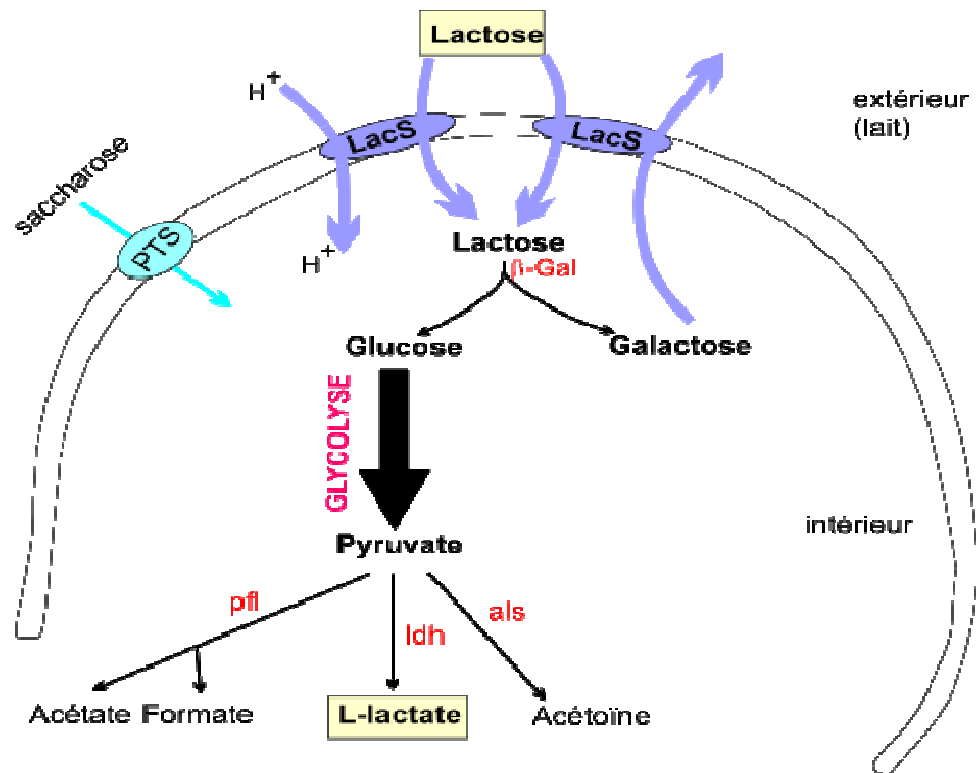


Figure 02 : Métabolisme des sucres chez *Streptococcus thermophilus* (Champagne et al., 1993)

1.1.3.3. Autres caractéristiques

Streptococcus thermophilus est rencontré dans les laits fermentés et les fromages (Dellaglio et al., 1994 ; Roussel et al., 1994). Elle est anaérobie facultative, chimioorganotrophe et catalase négative (Klaenhammer et al., 2002).

C'est une bactérie thermorésistante, elle survie à un chauffage de 65°C pendant 30 min, elle est sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques (Dellaglio et al., 1994).

La température optimale de croissance de cette souche est comprise entre 42 °C et 45°C, mais elle tolère des températures allant de 22°C à 52°C.

L'absence d'antigène du groupe D est une caractéristique de cette espèce (Bergey et al., 1984; Chandan, 2006 et Accolas et al., 1980). Cette espèce est capable de synthétiser des exopolysaccharides (EPS) soit en monoculture, soit en association avec la souche *Lactobacillus bulgaricus* (Novel, 1993).

Pour se protéger des effets dévastateurs du stress, allant du stress nutritionnel, thermique (hyper ou hypothermiques), osmotique aux stress oxydant ou acide, les bactéries lactiques et surtout *S. thermophilus* utilisent des protéines dites de stress qui ont pour rôle de protéger toutes les protéines bactériennes de la dénaturation, de participer à leur renaturation voir même éliminer les protéines dénaturées (Perrin et al., 1999).

1.1.4. Utilisations industrielles de *Streptococcus thermophilus*

En plus de son usage traditionnel en culture mixte avec *Lactobacillus bulgaricus* pour la fabrication du yaourt, *S. thermophilus* est utilisée dans la production de nombreux fromages tels que : l'Emmental, le Parmesan, le Provolone, la Mozzarella et l'Asiago. On l'utilise aussi depuis peu pour la production de fromage de type Cheddar en combinaison avec d'autres ferments mésophiles (Awad et al., 2005).

L'un des principaux rôles joués par *S. thermophilus* en industrie laitière est de garantir une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Cette vitesse d'acidification dépend de la souche utilisée (Mora et al., 2004).

Toutefois, l'utilisation de *S. thermophilus* ne repose pas uniquement sur la production de l'acide lactique, mais également la production du formate, d'acétoïne, du diacétyl et d'acétaldéhyde qui contribuent à la flaveur du produit fini. D'autres aspects technologiques importants sont cités, tels que la production d'exopolysaccharides (EPS) et de bactériocines (Mora et al., 2004).

1.2. Composition biochimique et valorisation du lactosérum

1.2.1. Généralités sur le lactosérum

Le lactosérum est le liquide jaune pâle résiduel obtenu suite à la précipitation et l'enlèvement de la caséine du lait pendant la fabrication du fromage (Marwaha et *al.*, 1988 ; Gonzfilez .S, 1996)

1.2.1.1. Différents types de lactosérum

Le lactosérum doit être considéré comme un produit dérivé plutôt qu'un sous produit de la fabrication des fromages, ou de la caséine. On distingue deux types de lactosérums : lactosérum doux et lactosérum acide (Linden et Lorient, 1994).

- **Lactosérum doux** : Ce lactosérum est également appelé lactosérum de fromagerie. Il est produit au cours de l'élaboration des fromages qui sont obtenus par la présure (fromages à pâte pressée cuite ou non cuite, et à pâte molle). Dans ce cas, on obtient un sérum doux pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. Son pH peut aller de 5,2 à 6,7.

- **Lactosérum acide** : Il regroupe l'ensemble des sous produits issus de l'élaboration de caséine et du fromage frais. Ce type de lactosérum est obtenu suite à la coagulation du lait par l'acide lactique ou l'acide chlorhydrique. Son pH varie de 3,8 à 4,6.

Les lactosérums acides sont moins riches en lactose et plus riches en minéraux. Ils sont aussi plusensemencés en germes lactiques et moins sujets à des fermentations que les lactosérums doux (Moletta, 2002).

1.2.2. Composition biochimique du lactosérum

La composition physico-chimique du lactosérum peut varier sensiblement selon le procédé de coagulation et selon la composition initiale du lait (saison, race des animaux, l'alimentation) (Bergel et *al.*, 2004) (Tableau I).

1.2.2.1. Eau

Le lactosérum se caractérise par une très grande dilution , il contient en moyenne 94% d'eau (Morr et *al.*, 1993 ; Linden et Lorient, 1994).

1.2.2.2. Lactose

Le lactose est le principal constituant du lactosérum (76 g/l) (Sottiez, 1990). Il représente l'essentiel de la matière sèche du sérum, c'est un diholoside constitué par l'union d'une molécule de α ou β - D- glucose et d'une molécule de β -D-galactose (Luquet et François, 1990).

Lactosérum

Le lactose est caractérisé par : Une solubilité limitée, Un pouvoir sucrant faible. Sa seule source importante dans la nature est le lait et les produits laitiers (Visser et *al.*, 1988).

Tableau I : Composition moyenne du lactosérum doux et acide (Morr et *al.*, 1993 ; Linden et Lorient, 1994)

	Lactosérum doux (%)	Lactosérum Acide (%)
pH	6,3	4,6
Eau	93	93,5
Lactose	4,77	4,71
Protéines	0,82	0,75
Matière grasse	0,07	0,03
Acide lactique	0,15	0,55
Cendres	0,53	0,69
Calcium	0,05	0,13
Sodium	0,07	0,06
Potassium	0,13	0,15
Phosphore	0,06	0,09

1.2.2.3. Minéraux

Dans certains procédés de fabrication des fromages, il y a l'étape de salage où il y a addition de sels, qui avec toutes les matières minérales en solution dans le lait se retrouve dans le lactosérum. Les 8 à 10% des matières salines de l'extrait sec du sérum sont constitués de chlorures de sodium et de potassium (50%) et le reste de différents sels de calcium, principalement sous forme de phosphate de calcium (Vrignaud, 1983).

D'après Méreo (1971), ces sels minéraux constituent les éléments indésirables «du sérum». En effet, il semblerait qu'une quantité relativement élevée constitue un obstacle à l'utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine et infantile.

1.2.2.4. Protéines

Les protéines ne forment pas la fraction la plus abondante du lactosérum (13,5 g/l), mais elle est la plus intéressante sur le plan économique et nutritionnel. Il s'est avéré que la valeur nutritionnelle des protéines sériques du lait est supérieure à celle des protéines du blanc d'œuf prises comme protéines de référence (Sottiez, 1990).

Deux grandes familles de protéines entrent dans la composition du lait à savoir, la première famille est constituée de caséines qui représentent environ 80% des protéines totales du lait et la seconde est composée des protéines solubles constituées essentiellement selon (MORR, 1993).de :

- La β - lactoglobuline (β - LG) :3,2 g /kg ;
- L' α - lactalbumine (α -LA) : 1,2 g /kg ;
- L'albumine sérique bovine (BSA) : 0,4g/kg ;
- Les immunoglobulines (Ig) :0,75g/kg ;
- Les protéoses peptones.0,1 à0,2 g/kg.

1.2.2.5. Matière grasse

La matière grasse n'est pas abondante dans le lactosérum, elle est estimée à un taux de 1,00 g/l (Sottiez, 1990). Une certaine quantité de lipides du lait est entraînée dans le sérum brut, cependant cette quantité est faible. La matière grasse peut être récupérées est utilisée dans la fabrication d'un beurre de second choix (Boudier et *al.*, 1979).

1.2.3. Valorisation du lactosérum

La richesse du lactosérum a conduit plusieurs chercheurs et industriels à mettre en oeuvre une stratégie de multivalorisation de ce sous-produit. Dans ce contexte, le lactosérum trouve son utilisation dans des domaines variés.

1.2.3.1. Alimentation humaine

Le lactosérum trouve son emploi dans diverses industries alimentaires, dans la confiserie et dans l'élaboration de préparations laitières très anciennes et pauvres en matière grasse (recuite, ricotta, brocciu, sérac, brunost). Des essais préliminaires ont montré que l'isolat de lactosérum, à raison de 24 à 45 g par jour peut agir favorablement sur le système immunitaire défaillant des malades. Les concentrés de protéines de lactosérum sont très utilisés en musculation, leur haute teneur en protéines ainsi que leur faible teneur en matière grasse et en calories en font un complément de choix avant et après l'entraînement physique. On prête aux protéines contenues dans le lactosérum un grand rôle dans la reconstruction des fibres musculaires qui ont subi des micro-déchirures lors de l'entraînement. L'absorption d'environ 20 g de protéines durant ou juste après l'exercice est suffisant pour maximiser la synthèse post-entraînement des protéines musculaires (Boudier et Luquet, 1980).

1.2.3.2. Alimentation animale

L'alimentation animale constitue la principale débouchée du lactosérum, il est destiné à l'élevage industriel des porcs ou bien, il est incorporé dans la ration alimentaire des vaches laitières. Il peut également être ajouté aux aliments d'allaitement pour veaux (Agnes, 1986).

1.2.3.3. Substrat de fermentation

Le lactosérum pourrait être un substrat de fermentation pour de nombreuses espèces microbiennes. Selon Botfonja (1994), la croissance de certaines souches telles que *Streptococcus lactis* serait bonne sur lactosérum seul, du fait de la richesse de celui-ci en lactose.

Le lactosérum est un bon milieu de culture permettant le développement des levures qui utilisent le lactose comme source de carbone (Omar et Sabry, 1991).

Bergmaier (2002) a étudié la production des exopolysaccharides par fermentation sur un milieu à base de perméat de lactosérum en utilisant des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW 9595M.

Lactosérum

Selon Poget-Ramseier (1993), le lactosérum est un bon milieu de culture pour la production d'acide lactique par les bactéries lactiques.

Etant donné que, la composition du lactosérum est déficiente en facteurs de croissance indispensables pour la multiplication de certaines bactéries, dans plusieurs études, il a été enrichi par ajout d'additifs tels que : l'extrait de levure, les bicarbonates de sodium et le tween 80 (Yang et Silva, 1995).

1.3. Caractéristiques et production de l'acide lactique

1.3.1. Historique

L'acide 2-hydroxypropanoïque ou acide lactique est l'élément principal de tous les produits laitiers acidifiés aux quels il donne leurs caractéristiques fondamentales. Il fut identifié en 1847 par **Blondeau**, comme produit de la fermentation bactérienne et mis en évidence pour la première fois dans le lait par Scheele en 1870 (Vick Roy, 1985). Chaque année, environ 50 000 à 80 000 tonnes d'acide lactique sont produites à travers le monde dont 90% sont réalisées à partir de fermentation microbienne. Les 10% restants sont produits synthétiquement à partir du Lactonitrile (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

1.3.2. Propriétés optiques et physicochimiques de l'acide lactique

L'acide lactique est un intermédiaire métabolique retrouvé dans de nombreux organismes vivants allant des procaryotes anaérobies à l'homme et représente l'un des acides organiques les plus importants (Mirdamadi, 2002).

L'acide lactique (acide 2-hydroxy-propionique), est l'un des acides organiques les plus importants. C'est un produit naturel non toxique, odorant, soluble dans l'eau, incolore et très peu volatil. Sa formule chimique est le $C_3H_6O_3$, il possède un carbone asymétrique, donc il existe sous forme de deux énantiomères : **L (+)** acide lactique ou **(S)** acide lactique, son image dans un miroir, est la forme **D(-)** acide lactique ou **(R)** acide lactique (figure 03).

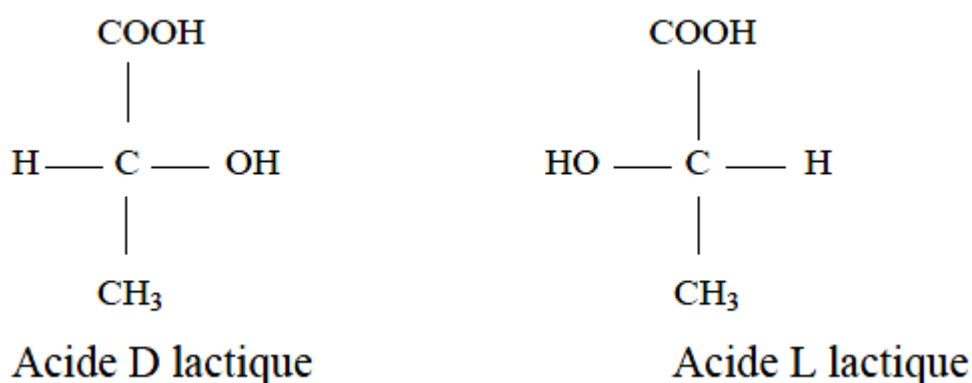


Figure 03: Les deux isomères optiques de l'acide lactique (Jarry, 1994).

L'acide lactique est utilisé comme un additif alimentaire selon la FDA (Food and Drug Administration). Utilisé pour acidifier des confitures, des gelées, des confiseries, des boissons gazeuses et autres produits. Il peut être additionné à la saumure au cours de la fabrication des marinades et des olives, pour prévenir les défauts de fermentation ou de conservation. Il sert

d'agent de conservation du poisson et d'autres aliments. Sous forme de lactate de calcium, il fait partie des ingrédients de la levure chimique.

La forme **L(+)** de l'acide lactique est mieux métabolisée que la forme **D(-)** (Bouraqadi I., 2006), ceci est dû à la présence de la L- lactate déshydrogénase chez l'être humain (Naveena et *al.*, 2004). Selon la FAO/OMS, dans le cas d'un nouveau née, l'immaturité du foie ne lui permet pas de métaboliser complètement la forme **D(-)**, entraînant ainsi un risque d'acidose.

1.3.3. Voies d'obtention de l'acide lactique

L'acide lactique possède un potentiel chimique important, c'est pourquoi il est largement utilisé en industrie. Il apparaît comme un très bon conservateur naturel des aliments (Givry, 2006). L'acide lactique est produit par deux voies distinctes : soit par synthèse chimique, soit par fermentation bactérienne, cette dernière voie est la plus utilisée, car elle représente 90% de la production mondiale de l'acide lactique (Rojan et *al.*, 2007)

1.3.3.1. Voie chimique

La synthèse chimique se fait à partir du Lactonitrile, coproduit issu de la synthèse de l'acrylonitrile, qui est réalisée à partir du cyanure d'hydrogène et de l'acétaldéhyde. Le Lactonitrile brut est récupéré et purifié par distillation, ensuite, il est dégradé en acide lactique à l'aide de d'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique. La purification de l'acide lactique est réalisée par estérification avec du méthanol (Datta et *al.* 1995).

1.3.3.2- Voie fermentaire

La synthèse de l'acide lactique par voie fermentaire permet de produire le stéréo-isomère désiré grâce à l'utilisation de bactéries lactiques homofermentaires.

Après les fermentations qui sont réalisées en batch pendant 4 à 6 jours, du carbonate de calcium est ajouté afin de neutraliser l'acide produit. Cet apport entraîne la formation de sels de calcium de l'acide, permettant une séparation plus facile par filtration puis par évaporation, ces sels seront ensuite acidifiés avec de l'acide sulfurique afin de les convertir en acide lactique et en sulfate de calcium insoluble qui sera séparé par filtration. Une purification par des colonnes échangeuses d'ions est enfin réalisée sur ce filtrat, suivie d'une évaporation afin de produire l'acide lactique alimentaire, qui s'avère peu stable à la chaleur (Datta et *al.*, 1995) (Figure 04) .

Acide lactique

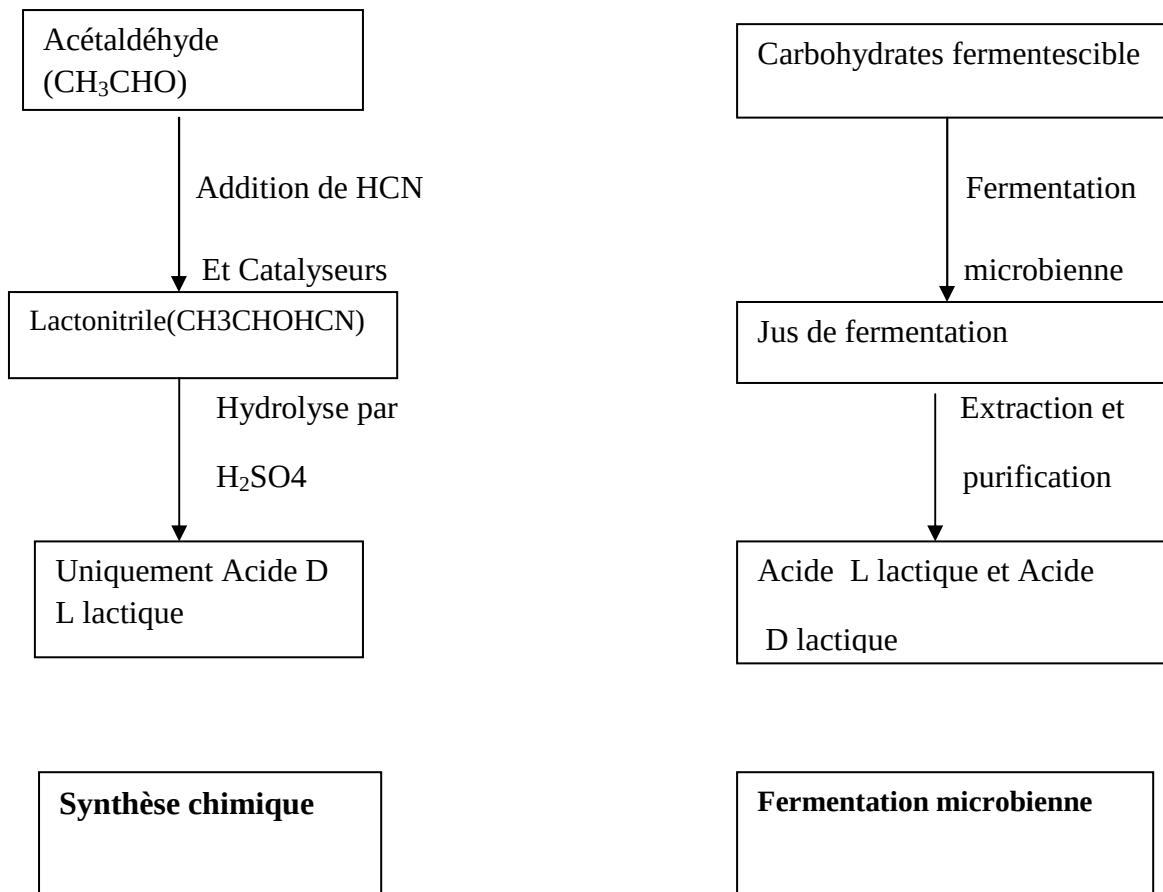


Figure 04: Schéma récapitulatif des deux voies de production de l'acide lactique (Narayanan et *al*, 2004).

La différence entre ces deux modes de production réside dans l'obtention d'un acide lactique pur optiquement. La synthèse chimique ne peut produire que des mélanges racémiques. Contrairement à la synthèse biologique qui permet d'obtenir une pureté optique, grâce au choix d'une souche ne produisant que l'acide D- ou L- lactique (Hofvendahl et Hahn- Hägerdal, 2000).

La synthèse chimique de l'acide lactique est moins utilisée à cause de ses effets néfastes sur l'environnement, et même que la demande de source chimique est très limitée (Narayanan Et *al.*, 2004)

1.3.4. Utilisations de l'acide lactique

Actuellement, 85% de l'acide lactique produit est principalement utilisé dans l'alimentation ou dans des applications liées à l'alimentation, alors que 15% de la production

Acide lactique

restants sont utilisés pour des applications non alimentaires (les industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques, celles du cuir, ou comme herbicide) (Sreenath et *al.*, 2001).

Il est également employé dans les industries chimiques pour la synthèse de certaines molécules comme : l'ester de lactate, l'acétaldéhyde, l'acide acrylique, l'acide propénoïque . Comme il est polymérisé en acide polylactique biodégradable (Figure 05) (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 2000).

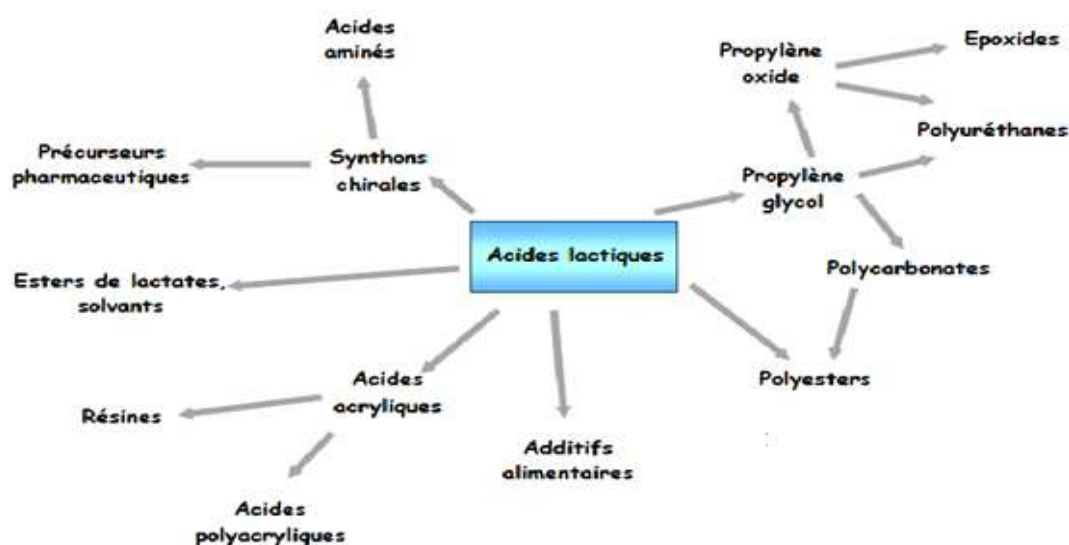


Figure 05: Les différentes applications de l'acide lactique (Schaafsma, 1996).

1.3.4.1. Applications alimentaires

Une large partie de l'acide lactique est utilisée pour produire des agents émulsifiants appliqués en boulangerie . Il est également utilisé comme acidulant (cas d'une boissons gazeuses, des conserves de cornichon ou dans la préparation de bonbons acidulés).

Il a aussi été indiqué comme agent de conservation des aliments (SIN270) ou d'autres produits (F.D.A., 1982). Cependant, il ne semble pas posséder d'action Bactériostatique ou fongistatique en dehors de son acidité. A ce point de vue , il est nettement moins efficace que l'acide acétique (Wee et *al.*, 2006) .

1.3.4.2. Applications dans l'industrie pharmaceutique ou médicale

L'acide lactique et l'éthyle lactate ont longtemps été utilisés dans des applications et des formulations pharmaceutiques, particulièrement dans les lotions, les solutions parentérales et les polymères lactiques-glycoliques biodégradables pour des applications médicales. Il est également utilisé pour la libération contrôlée des médicaments dans des fibres creuses, elles-mêmes biodégradables (Lipinski et Sinclair, 1986).

Cet aspect avantageux est encore mis à profit dans des implants chirurgicaux ou des fils de suture. Les sels d'acide lactique, obtenus avec le calcium sont employés dans la thérapie des insuffisances en calcium et comme agents contre les caries dentaires (Jarry, 1994).

1.3.4.3. Application comme désinfectant et détergent

L'acide lactique et ses sels sont appliqués dans la désinfection des carcasses de bovins, de volailles et des poissons. Il est aussi utilisé comme détergents (Jarry, 1994).

1.3.4.4. L'emploi comme plastifiant

Les lactates exercent en général une importante action plastifiante en combinaison avec les protéines. Cette action se manifeste par un ramollissement, un gonflement et une augmentation de l'extensibilité du produit.

Le lactate de calcium est, de son côté, utilisé pour plastifier des produits à base d'albumine, ou de gélatine de caséine. Par exemple, dans la préparation des meringues du nougat et dans les produits moussés, l'addition de 1% de lactate de calcium produit un effet sensible et permet soit d'améliorer les propriétés mécaniques de la mousse, soit d'augmenter son volume.

1.3.4.5. Applications dans l'industrie du textile

L'acide lactique a longtemps été utilisé dans l'industrie du cuir pour le chaulage et le tannage. Il a aussi été utilisé dans les étapes de finition du textile.

1.3.4.6. Applications dans l'industrie cosmétique

L'éthyle lactate est la substance active dans les solutions anti-acné, il est employé comme agent hydratant, il s'avère souvent meilleur que les produits naturels. L'acide lactique est utilisé, également, dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux, et dans les dentifrices comme agent détartrant (Smith *et al.*, 1977 ; Narayanan *et al.*, 2004).

1. 3.4.7-Applications dans l'agriculture

L'agriculture consomme l'acide lactique dans le traitement anti-brunissement des fruits, dans l'acidification des fourrages ensilés et comme intermédiaire dans la préparation des produits phytosanitaires et surtout dans le système de relargage pour engrais et pesticides (Lipinski et Sinclair, 1986 ; Jarry, 1994). Comme il est très efficace pour lutter contre les varroas en apiculture (Schultermandl et Imdorf, 2002).

Partie II : Etude expérimental

Matériel et Méthodes

2. Présentation de La Laiterie

Le FERMIER est une unité privée qui se charge de la production du lait et des produits laitiers à base de lait de vache et de chèvre (100%) collecté au niveau de la région de Tizi – Ouzou . Elle a été créée en 2004, sa capacité de transformation est estimée à 3500 litre/jour .

Cette laiterie présente une gamme de produit variés (Fromage à pate molle, le BRIE, le CHEVRE, Fromage à pâte pressée, lait de vache pasteurisé, l'ben).



LE FERMIER
fromage à pâte molle
(camembert)



Fromage à Patte pressé



LE BRIE DU FERMIER/
fromage à pâte molle.



Lait pasteurisé conditionné



LE CHEVRE DU FERMIER/ fromage à
pâte molle.



L'ben

Figure 06: Les dérivés laitiers produits au sein de l'unité LE FERMIER

L'unité **STLD (société de transformation du lait et dérivés)** le FERMIER comporte plusieurs **services** afin d'assurer le bon fonctionnement de l'entreprise, qui sont :

- | | |
|----------------------|--------------------|
| -Service commercial | -Service directeur |
| - Service caisse | - Moyens généraux |
| - Service comptable | -Réception |
| -Service qualité | -Collecte |
| -Service secrétariat | -Gérant |
| -Laboratoire | -Emballage |

Lors de sa création, la laiterie (FERMIER) a fixé des missions et des objectifs afin de fabriquer des produits de meilleure qualité, et qui sont :

- Etablir des normes propres à l'entreprise pour le choix de la matière première par excellence (qualité bactériologique, physico-chimique, organoleptique)
- Diversifier la production et lancer de nouveaux produits.
- Régler les problèmes de contaminations rencontrés en cours de production

2.1. Matériel et méthodes

Notre travail a pour but d'optimiser la production de l'acide lactique à partir du lactosérum doux prélevé au sein de l'unité de production des produits laitiers (le FERMIER).

La partie expérimentale de l'étude a été réalisée dans la période allant d'avril (2015) à juillet (2015), au niveau des laboratoires suivants :

- Laboratoire d'autocontrôle de l'unité (le FERMIER) ;
- Laboratoire pédagogique de Biochimie (département Biologie, UMMTO) ;
- Laboratoire pédagogique de Microbiologie (département Biologie, UMMTO).

2.1.1. Matériel

La partie expérimentale a été sous tendu par le matériel cité ci- dessous :

2.1.1.1. Matériel biologique

Souche *Streptococcus Thermophilus* isolée du yaourt

2.1.1.2. Produits et réactifs

- **Acides et solvants** : Alcool isoamylique, Acide sulfurique,
- **Réactifs** : Réactif de Folin- Ciocalteu, Phénolphtaléine, DNS
- **Autres produits** : Bouillon et gélose M17, TSE, NaOH, BSA, Glucose, Lactose, Acétate de Zinc, Hexacyanoferrate II de Potassium, Sulfate de cuivre, Tartrate double de Na et K.

2.1.1.3. Appareillage

- PH mètre (Memmert,) ;
- Dessiccateur infra rouge (SARTORIUS) ;
- Centrifugeuse de paillasse, MAX 45000 rpm (SIGMA) ;
- Balance de précision (Max 1000g, d= 0,1(KEREN) ;
- Agitateur magnétique ;

- Agitateur de tube (Vortex) ;
- Spectrophotomètre (UV- Visible) ;
- Bain marie (Memmert, Allemagne) ;
- Etuves (Memmert,) ;
- Autoclave (SF105/SN webco).

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Prélèvement et préparation des échantillons

Le prélèvement des échantillons du lactosérum ayant servi aux différents essais expérimentaux a été effectué au niveau de l'unité de production des produits laitiers « LE FERMIER », il a été effectué sur la même production à l'étape du moulage du camembert, puis ils ont été acheminés au laboratoire dans une glacière.

2.1.2.2. Analyses physico chimiques et microbiologiques

2.1.2.2.1. Analyses physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques ont été réalisées sur du lactosérum brut avant et après stérilisation, elles ont porté sur la mesure du : pH, l'acidité titrable, l'extrait sec totale, la matière grasse, les protéines et enfin le lactose. Toutes les analyses ont été effectuées en 3 essais.

2.1.2.2.1.1. Détermination du pH

Par définition, le pH « pouvoir hydrogène » s'exprime en fonction de la concentration en ions hydrogènes. Il est mesuré par la méthode potentiométrique à l'aide d'un PH mètre (Amariglio, 1986).

Les valeurs de pH sont obtenues par immersion de l'électrode du pH mètre dans l'échantillon.

2.1.2.2.1.2. Détermination de l'acidité titrable et de l'acide lactique

L'acidité titrable est déterminée par la méthode titrimétrique où l'acide lactique est neutralisé par le NaOH 0,11N. La présence de phénolphthaléine comme indicateur coloré indique la limite de la neutralisation par changement de couleur vers le rose pâle. L'acidité est exprimée en degré Dornic (°D) où 1°D représente 0,1 g /l d'acide lactique dans lactosérum) (Annexe 01).

La teneur en acide lactique a été déduite de l'acidité titrable

2.1.2.2.1.3. Détermination de l'extrait sec total

L'extrait sec total a été déterminé à l'aide d'un dessiccateur à infrarouge. Le principe repose sur la dessiccation par évaporation de l'eau du lactosérum et pesée du résidu sec (AFNOR, 1980) (Annexe 02).

2.1.2.2.1.4. Détermination de la teneur en matière grasse (méthode de GERBER)

La teneur en matière grasse est déterminée par la méthode acido-butyrométrique (méthode de Gerber). Le principe de cette méthode est basé sur la dissolution du produit à doser (excepté la matière grasse) par l'acide sulfurique, sous l'influence d'une force centrifuge et grâce à l'adjonction de l'alcool isoamylique, la matière grasse se sépare en couche claire dont la graduation du butyromètre révèle le taux (Annexe 03).

2.1.2.2.1.5. Détermination de la teneur en protéines (méthode de LOWRY et al., 1951)

Le taux des protéines sériques est évalué par la méthode colorimétrique (méthode de Lowry). Le réactif de folin ciocalteu (acide phospho-tungsto-molybdique) est plus au moins réduit par les protéines (groupement oxydés des acides aminés), notamment des groupements phénoliques du tryptophane et de la tyrosine, et dans une moindre mesure la cystéine et l'histidine (DELOBETTE et al., 1991).

Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : Le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm. La valeur de densité optique donnée par le spectrophotomètre permet, par projection linéaire sur une courbe d'étalonnage $D.O = f(C)$ (Figure 07), réalisée avec la BSA comme protéine de référence, de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé (Annexe 05).

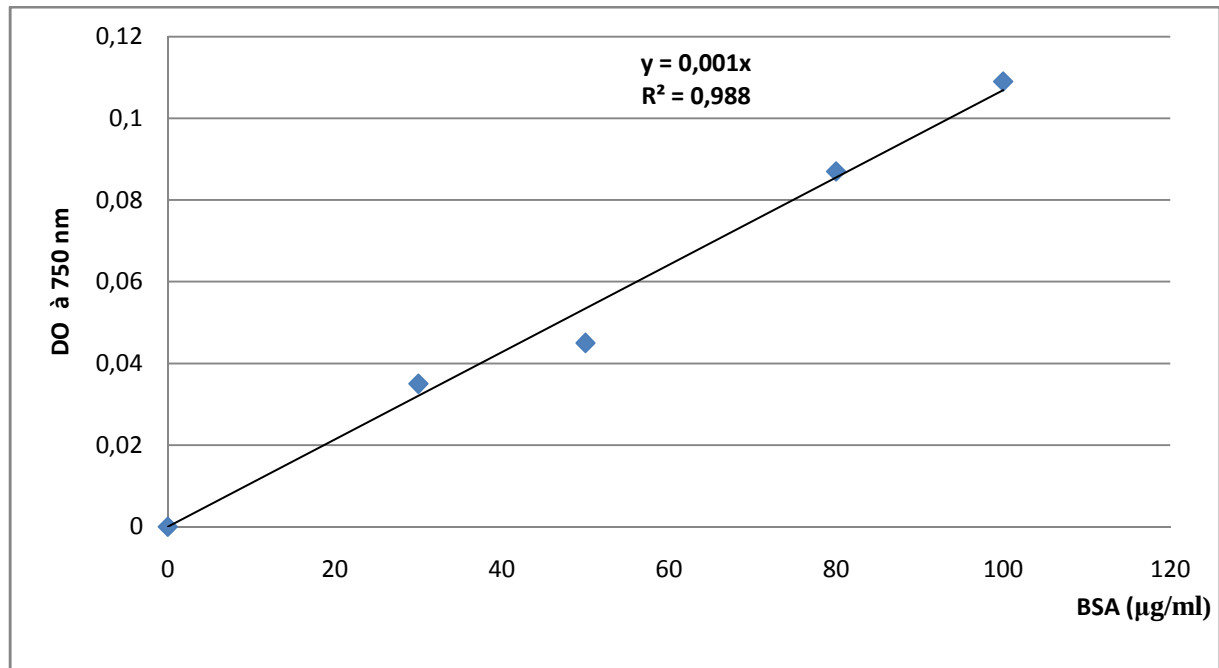


Figure 07: Courbe étalon pour le dosage des protéines sériques par la méthode de Lowry et *al.*, (1951) en utilisant la BSA comme protéine étalon

2.1.2.2.1.6. Dosage du lactose en utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

Le dosage du lactose est réalisé par une méthode colorimétrique (au DNS). En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5 dinitrosalicylique est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs (Figure 08). Le composé obtenu est rouge orange à reflets pourpres. Il peut être dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 530\text{nm}$) (Annexe 04).

La concentration en sucres réducteurs est obtenue à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des solutions connues de glucose

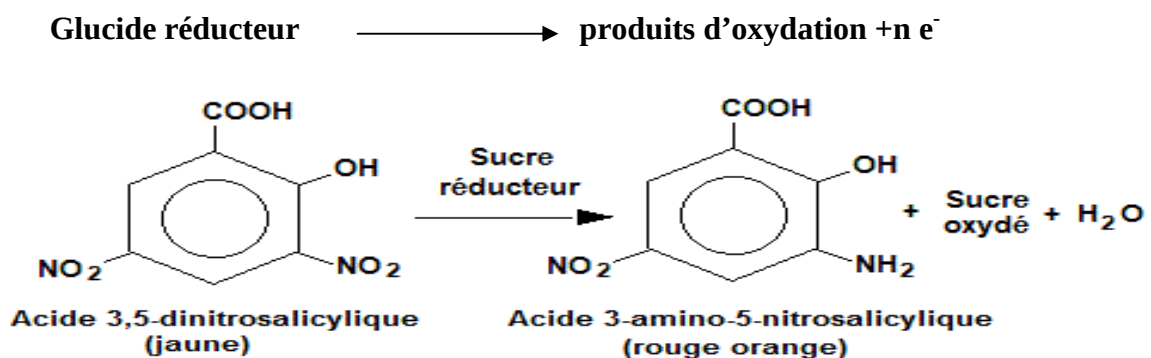


Figure 08 : Réaction de réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (aussi appelé acide 3-amino-2-hydroxy-5-nitrobenzoïque)

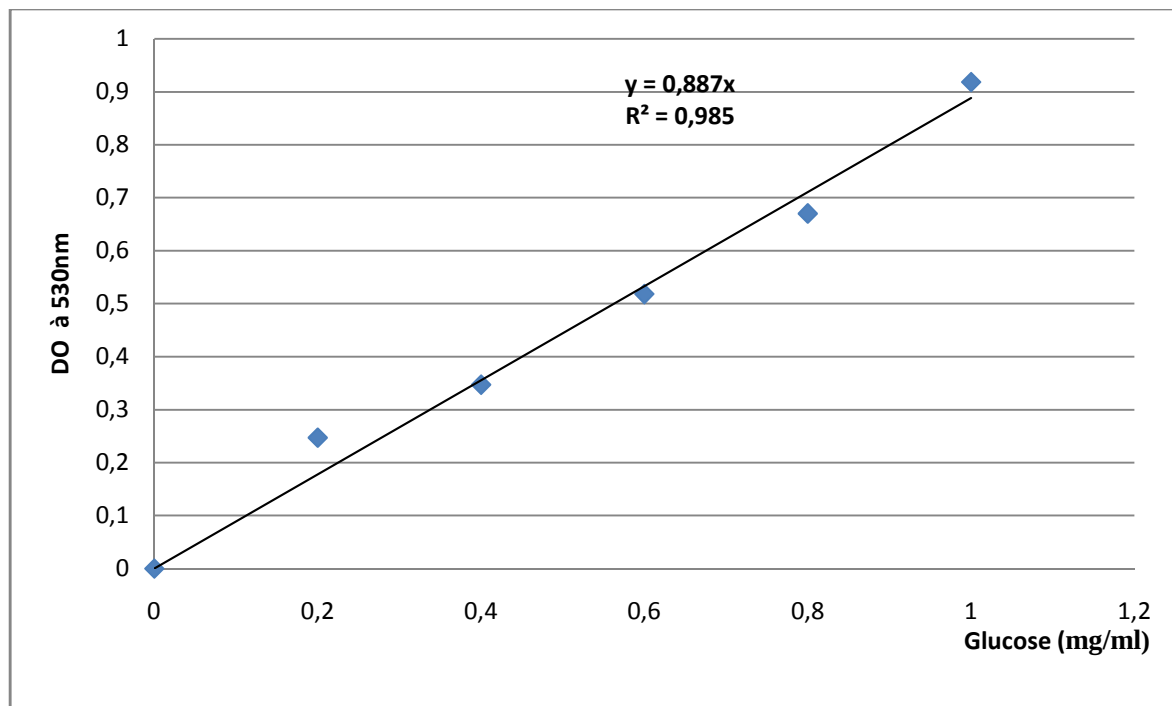


Figure 09: courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode du DNS, en utilisant des solutions connues de glucose .

2.1.2.2. Méthodes microbiologiques

La partie Microbiologique a pour but de mener des fermentations sur du lactosérum doux afin de produire de l'acide lactique par *Streptococcus thermophilus*.

2.1.2.2.1. Isolement et identification de la souche *Streptococcus thermophilus*

2.1.2.2.1.1. Isolement de la souche

L'Isolement de la souche de *S. thermophilus* a été effectué à partir d'un yaourt ferme commercialisé, la solution mère a été préparée par l'introduction de 25g du yaourt dans 225 ml du milieu TSE dans des conditions d'asepsie (figure 10, étape 01) ;

Après homogénéisation de la solution mère, 1 ml a été prélevé et introduit dans 9 ml du bouillon M17. La culture a été incubée à 42°C pendant 24 à 48 h (Figure10, étape 01) ;

Après 24 h d'incubation, des ensemencements en surface sur gélose M17 ont été effectués, puis incubation à 42°C pendant 24 à 48h (Figure 10, étape 03).

Des repiquages successifs sur la gélose M17 ont été effectués pour assurer la pureté de la souche.

Matériels et méthodes

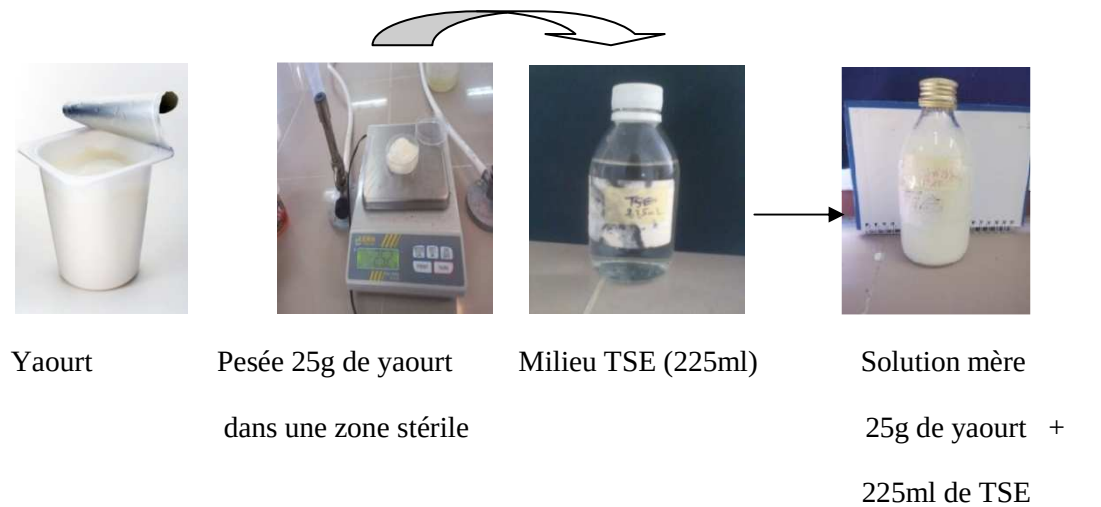
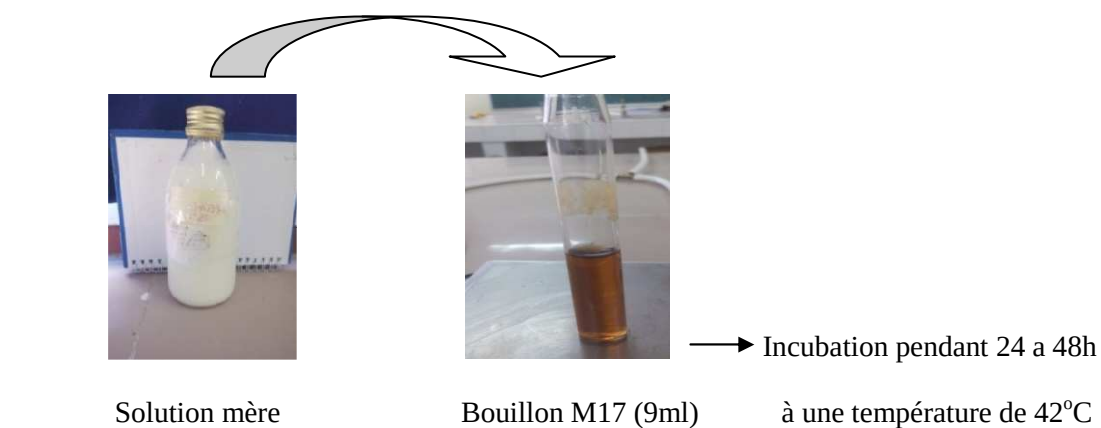
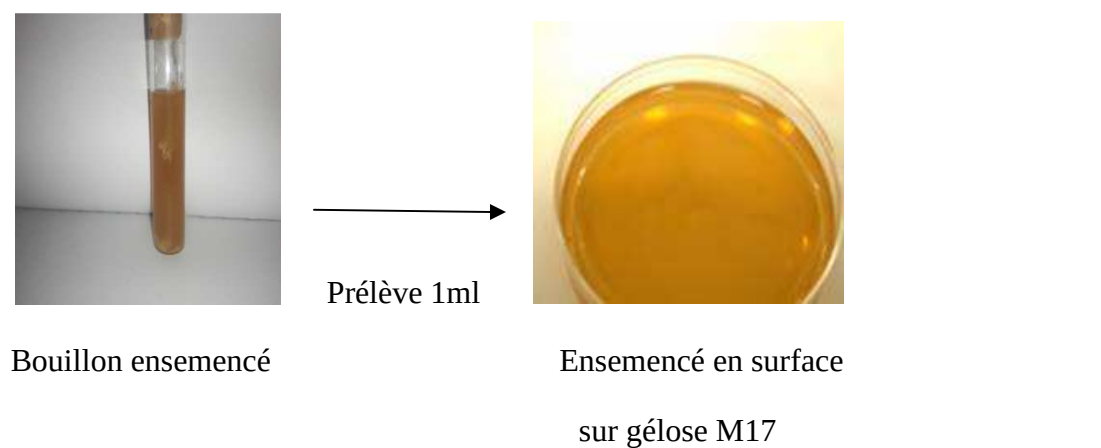
- 1) Introduire dans une zone stérile dans du TSE
- 
- Yaourt Pesée 25g de yaourt Milieu TSE (225ml) Solution mère
dans une zone stérile 25g de yaourt +
225ml de TSE
- 2) Prélever Aseptiquement 1 ml de la solution mère
Après agitation et introduire dans 9ml du bouillon M 17
- 
- Solution mère Bouillon M17 (9ml) Incubation pendant 24 a 48h
à une température de 42°C
- 3)
- 
- Bouillon ensemencé Prélève 1ml Ensemencé en surface
sur gélose M17

Figure10 :l'isolement de *Streptococcus thermophilus*

2.1.2.2.1.2. Identification de la souche

L'identification de la souche de *S. thermophilus* a été réalisé a travers des testes microbiologiques telle que la coloration de Gram par réalisation de frottis après chaque repiquages.

Les résultats microscopique montre que c'est une souche a Gram + (Annexe 08) ; ou les colonies sont observés sous forme de chainette, sphérique et bien ovoïdes.

Le teste catalase nous a permet également de confirmer la souche bactérienne étudié ; la dilution de colonies sur une lame par quelques gouttes d'eau oxygéné. N'a pas marqué une effervescence, de ce faite l'étude morphologique détermine que c'est catalase négative(-) (Annexe 07).

2.1.2.2.1.3. Conservation de la souche

Après purification et identification de la souche de *S. thermophilus*, des repiquages sur milieu M17 incliné en tubes ont été effectués puis incubés à 42°C pendant 24h. Les cultures ainsi obtenues ont été conservées à + 4°C (annexe 6).

2.1.2.2.2. Préparation du lactosérum

Avant son utilisation comme substrat de fermentation, le pH du lactosérum a été ajusté à différentes valeurs (6,5 - 6 -5,5) avec du HCl 0,1 N, puis il a été filtré et stérilisé par tyndallisation à une température de 80°C pendant 30 min. Le traitement a été répété 3 fois dans des intervalles de temps d'environ 12H

2.1.2.2.3. Réalisation des fermentations

2.1.2.2.3.1. Préparation des précultures

Une suspension bactérienne dense sur bouillon TSE a été préparée en prélevant quelques colonies de la souche isolée, 1ml de cette suspension a été transféré dans 9 ml du milieu M17 liquide qui est incubé à 42°C pendant 24 à 48h.

Après 24h d'incubation, 1ml de cette première préculture est introduit dans des flacons contenant 30 ml du bouillon M17 incubé à 42°C pendant 24 à 48h (Figure 11). Cette dernière préculture nous a servi afin d'inoculer le lactosérum pour les fermentations ultérieures.

Matériels et méthodes

1)

Prélever Aseptiquement quelques colonies
et introduire dans 9ml du bouillon M



Colonie de *S.thermophilus*



Bouillon M17

→ Incubation pendant 24 à
48h à 42°C

2) Prélever aseptiquement 1ml du bouillon

Ensemencé Dans 30 ml du bouillon M17



Bouillon ensemencé



30ml de bouillon M17

→ Incubation pendant 24 a 48 heures a une
temperature de 42°C

Figure 11: Les étapes de préparation de la préculture

2.1.2.2.3.2. Fermentation

La fermentation en batch (discontinue) est réalisée dans des erlenmeyers stériles d'une capacité de 500 ml contenant 300 ml du milieu de culture (lactosérum doux tyndallisé). Le lactosérum estensemencé stérilement par 30 ml de la deuxième Préculture (annexe). Les incubations ont été effectuées soit à 37°C ou à 42°C pendant 24H.(Annexe 09)

- **Paramètres étudiés au cours de la fermentation**

Dans le cas de notre étude nous avons effectué trois fermentations, pour chacune d'elle nous avons fixé certains paramètres et varié d'autres :

- La température (37 et 42°C)
- pH (5.5-6-6.5)
- Le taux d'inoculum (10%-15%-20%)

La croissance de *Streptococcus thermophilus* sur le lactosérum a été déterminée par le suivie de certains paramètres physico chimiques (Biomasse, pH, Lactate, Lactose) dans des intervalles de temps de deux heures.

Résultats et discussions

3. Résultats et discussion

Les analyses physico-chimiques et microbiologiques du lactosérum doux qui est utilisé comme substrat de fermentation, nous ont permis d'avoir une idée globale sur ses différents constituants, afin d'assurer un milieu de culture adéquat pour lancer une fermentation microbienne.

3. 1. La Composition physico-chimique du lactosérum

Les résultats des analyses obtenues montrent dans l'ensemble une composition assez riche, se traduisant particulièrement par des teneurs acceptables en protéines, lactose, matière grasse et en extrait sec total.

A côté de cette tendance générale, il semble évident que cette composition est susceptible de variation sous l'influence et l'interaction de plusieurs paramètres en liaison avec le lait.

Les résultats obtenus concernant les analyses physico-chimiques sont rapportés sur le (Tableau II).

Tableau II : Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum

Paramètres	Lactosérum doux avant tyndallisation	Lactosérum doux après tyndallisation	Travaux de WOO (2002)
PH (à 25,6°C)	6 ,41±0.005	6 ,45±0.028	6,5
MG (g/l)	4,3±0.091	3.00±0.080	1.00
EST (g/l)	63,03±0,005	62.7±0,009	65,00
Acidité (°D)	13,5±0,28	9.8±0.24	>12
Lactose (g/l)	33, 3±0,55	32.8±0,58	75,00
Acide lactique (g/l)	1, 35±0,28	0.98±0,24	2 ,20
Protéine (g/l)	5,8±0,06	5.1±0,09	12

3.1.1. pH

Les valeurs de pH mesuré sont d'une moyenne de 6.41 avant tyndallisation et 6,45 après tyndallisation,

Ces valeurs ne présentent pas une différence significative par rapport à la norme (Woo, 2002) qui est de l'ordre de 6.5

3.1.2. Matière grasse

La moyenne de la teneur en matière grasse est évaluée à 4,3 avant tyndallisation et 3,00g/l après tyndallisation

Les valeurs trouvées dans la présente étude sont supérieures à celles de WOO (2002) qui vont de 1 à 2 g/l. Cela serait dû au brassage poussé effectué avant le décaillage du lait pour séparer le lactosérum du caillé où des fuites en matière grasse peuvent avoir lieu (WOO, 2002)

D'après Audic et *al.* (2003), la teneur en lipides du lactosérum dépend principalement de la teneur en matière grasse du lait utilisé pour la fabrication du fromage, et plus encore dans le lait qui n'est pas homogénéisé. Lorsque la teneur en matière grasse du lactosérum est supérieure à 0,1%, il est généralement écrémé ; la crème ainsi obtenue est soit transformée en beurre de lactosérum ou utilisée encore une fois à la normalisation de la matière grasse du lait de fromagerie.

La teneur en matière grasse après tyndallisation est de 3 g/l, elle est légèrement inférieure à celle obtenue avant tyndallisation, cela pourrait être dû à la probable dégradation des lipides sous l'effet de la chaleur.

3.1.3. L'extrait sec total

Le taux moyen en EST du lactosérum étudié est de 63,03 g/l, ce taux est légèrement faible comparé à celui avancé par Woo (2002) qui est de 65,00 g/l.

Cela pourrait s'expliquer probablement par le mauvais rationnement des vaches, ou au mouillage du lait collecté par l'unité. Etant donné, que L'EST est la résultante de la matière grasse, des protéines et du lactose, donc sa variation est liée directement à la qualité du lait de vache utilisé pour la fabrication du fromage à pâte molle type « Camembert ».

3.1.4. Acidité titrable et teneurs en acide lactique

L'acidité Dornic est la résultante de l'acidité naturelle du lait (liée à sa richesse en protéines et minéraux) à laquelle vient s'ajouter l'acidité développée (grâce à l'action des

Résultats et discussion

ferments lactiques qui transforment le lactose du lait en acide lactique) (Franworth et Mainville, 2010)

La valeur moyenne en acidité titrable obtenue pour les échantillons étudiés est de 13,5 °D, c'est une valeur qui se concorde avec les travaux de (Woo, 2002) (> 12°D), on remarque une légère hausse de ce paramètre dans notre cas.

Cela revient à l'acide lactique produit par les levains lactiques dans le lactosérum.

Après tyndallisation on remarque une baisse d'acidité qui est de 9,8°D, qui ne pourrait être dû qu'au traitement thermique.

Les teneurs de l'acide lactique sont déduites à partir de l'acidité titrable où 1°D = 0,1g/l d'acide lactique. La valeur trouvée avant tyndallisation est de 1,35g/l, et 0,98g/l après tyndallisation.

3.1.5. Lactose

Le lactose est le constituant le plus important du lactosérum, ainsi le substrat essentiel des ferments lactiques, il représente 70 à 75g/l (Britten, 2003 ; WOO, 2002), sa teneur initiale peut conditionner le déroulement de la fermentation, sa réduction peut limiter le déroulement de la fermentation et réduire en conséquence la baisse du pH, ce qui aura des effets sur la texture et le déroulement de l'affinage (Cayot, Lorient, 2001).

La valeur moyenne en lactose dans notre étude est estimée à 33,3 g/l, c'est une valeur très faible comparativement aux teneurs citées par la bibliographie.

Cette faible teneur pourrait être liée à l'activité microbienne élevée précoce lors des fabrications fromagères comme c'est expliqué par MC Sweeney (2004).

Après tyndallisation, on remarque une diminution de concentration de lactose de 0,5 g/l, cette perte en lactose pourrait être dû à l'hydrolyse de la molécule sous l'effet de la chaleur (80 °C).

3.1.6. Protéines

Les protéines du lactosérum, qui représentent 10 à 12g/l, c'est la fraction qui reste soluble lors d'une précipitation à pH 4,6 à 20°C des protéines du lait, elles représentent différentes entités (β -lactoglobuline, α -lactalbumine, immunoglobulines, albumine sérique bovine et les protéose-peptones) ayant une bonne valeur nutritionnelle et dotées d'activités biologiques variées (Fox et *al.*, 2000).

Résultats et discussion

Les moyennes des valeurs trouvées lors du dosage des protéines du lactosérum provenant de la production du fromage à pâte molle par la méthode de LOWRY est de 5,8 g/l, ce résultat est inférieure à celui donné par (Woo, 2002) (12g /l).

Le faible taux obtenu est dû probablement à la matière première déficiente en protéines utilisée lors de la fabrication du fromage.

Après tyndallisation on remarque une diminution de la teneur jusqu'à 5,1g/l car le lactosérum possède des protéines thermosensibles qui se dénaturent et précipitent à température élevée.

3.2. Résultats des analyses microbiologiques

3.2.1. Préparation du milieu de fermentation et isolement de la souche de *Streptococcus thermophilus*

L'efficacité du traitement de tyndallisation a été contrôlé par culture du lactosérum sur gélose nutritive (GN) et incubation à 37°C pendant 24 à 48h, après lecture des boîtes nous n'avons décelé aucune colonie bactérienne de contamination comme montré dans la (Figure 12), ce qui nous mène à parler de l'efficacité de la tyndallisation et de la stérilité du lactosérum qui sera utilisé comme substrat de fermentation.



(A) Avant tyndallisation



(B) Après tyndallisation

Figure 12 : Contrôle microbiologique de l'efficacité du traitement de la tyndallisation du lactosérum.

La souche de *Streptococcus thermophilus* utilisée lors des fermentations a été isolée à partir du yaourt commercialisé sur milieu de culture M17, Après des repiquages successifs sur ce milieu, la pureté de la souche est vérifiée.

Résultats et discussion

Sur M17 les colonies de *Streptococcus thermophilus* apparaissent blanchâtres, ovoïdes de 0,89 nm de diamètre (Figure 13)



Figure13 : Contrôle de la pureté de la souche *Streptococcus thermophilus* isolée

Sur milieu M17

A l'étude microscopique et après coloration de Gram, les cellules de *Streptococcus thermophilus* apparaissent sous forme de coques à Gram +, rassemblées en chainettes , elles sont catalase (–) (Figure14).



Figure 14 : Observation microscopique des cellules de *Streptococcus thermophilus*

Gx 1000 après coloration de Gram.

3. 3. Optimisation de la fermentation en Batch

3.3.1. Les paramètres physico-chimiques étudiés

L'évolution de la biomasse et du pH, la consommation du lactose et la production de l'acide lactique sont suivies à des intervalles de temps réguliers. Lors des fermentations, nous avons étudié l'effet de certaines conditions de culture (pH, température, taux d'inoculation) sur les paramètres sus- cités.

3.3.1.1. Effet de la température

Nous avons effectué deux fermentations à deux températures différentes (37°C et 42°C) et à pH constant (6,5) (Tableau III).

Tableau III : Conditions opératoires concernant l'optimisation de la température

Paramètres variables	Paramètres constants
Température : T1 : 37°C T2 :42°C	pH : 6,5 Inoculum : 10% (v/v de la préculture) Milieu de culture : 300ml du lactosérum Absence d'agitation



Figure 15 : Aspect de la Culture bactérienne après 2 heures de fermentation à 37 et à 42°C

Résultats et discussion

Les figures (16, 17, 18,19) représentent respectivement l'évolution de l'acide lactique, du lactose, du pH, de la biomasse, à deux températures (37 et 42°C) en fonction du temps.

Au bout de huit heures de fermentation, la croissance se ralentit et la phase stationnaire est observée au bout d'environ 10h.

D'après les figures (17) et (19), on constate que la croissance est meilleure à 42°C où elle atteint une valeur de 6,98 mg de matière sèche par litre du milieu de culture et de 3,8 g/l d'acide lactique. Cette croissance est abaissée à une température de 37°C, où la biomasse est de 5,7 mg de matière sèche par litre du milieu de culture, et l'acide lactique est de 3,63g /l.

Selon Rosso *et al.* (1995), quand la température du milieu se situe en haut ou en bas de température requise pour la croissance optimale, l'activité microbienne est réduite et les microorganismes peuvent éventuellement se détruire.

En effet, dans les systèmes biologiques, la température affecte le déroulement des réactions biochimiques et l'activité enzymatique bactérienne, donc affecte la croissance. (Tchobanoglous, 1979), ceci influence la production des lactates.

Durant les deux fermentations le pH diminue (Figure 16). Par exemple, à température 42°C et au bout de 6h, le pH passe de la valeur 5,652 à la valeur 5,534 et en fin de la fermentation à 5,158.

Selon la Figure (18) la dégradation du lactose est illustrée par une courbe décroissante ce qui traduit le fait que le lactose est consommé par la bactérie et converti par la suite en acide lactique.

Selon Boudjema K. (2008), l'évolution de la biomasse atteint une valeur de 1g/l à 42°C après 12h, alors que la quantité d'acide lactique produit également à cette température est d'environ 9,4g/l, cela confirme la baisse de la concentration du lactose allant de 57g/l jusqu'à environ 42g/l.

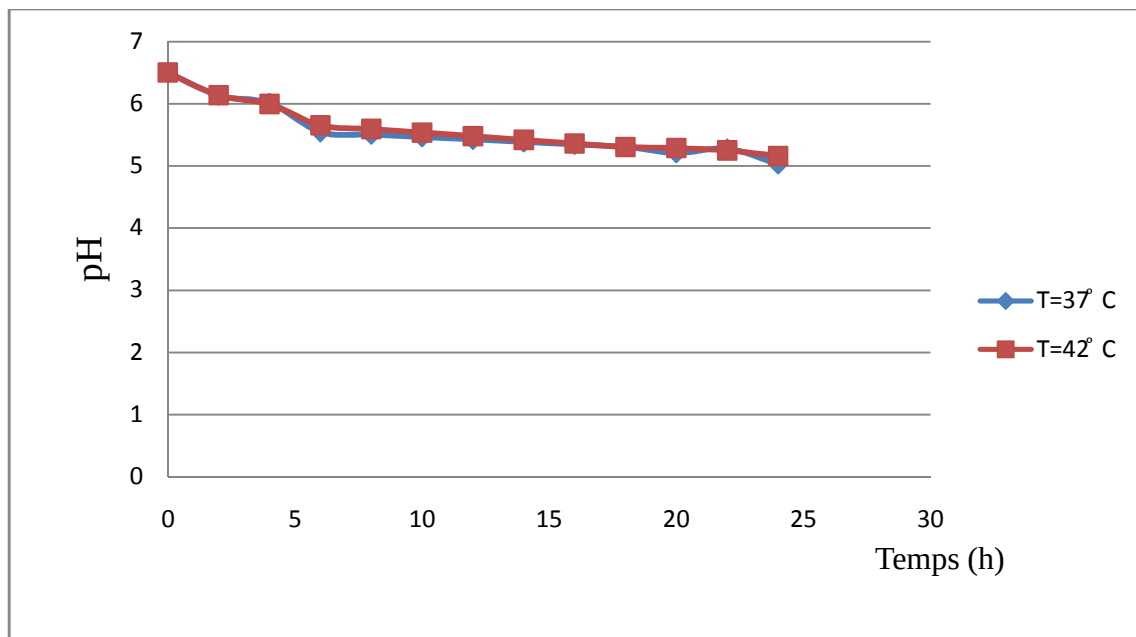


Figure 16 : Evolution du pH en fonction du temps et à différentes température et à pH constant

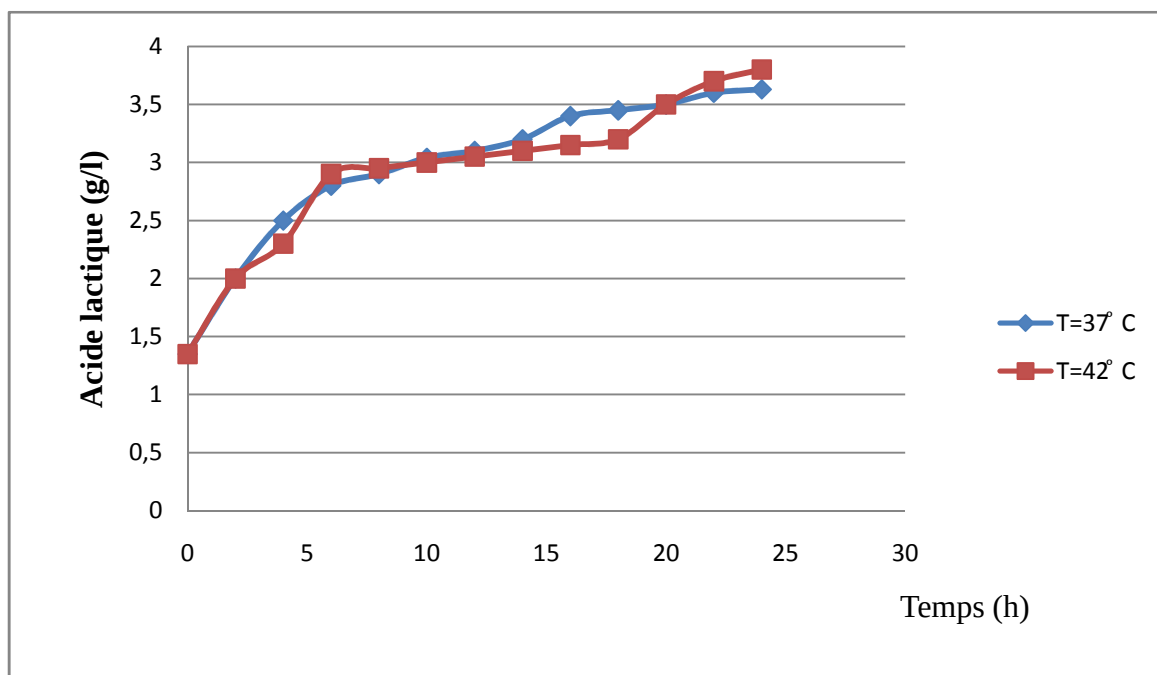


Figure 17 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps et à différentes température et à pH constant

Résultats et discussion

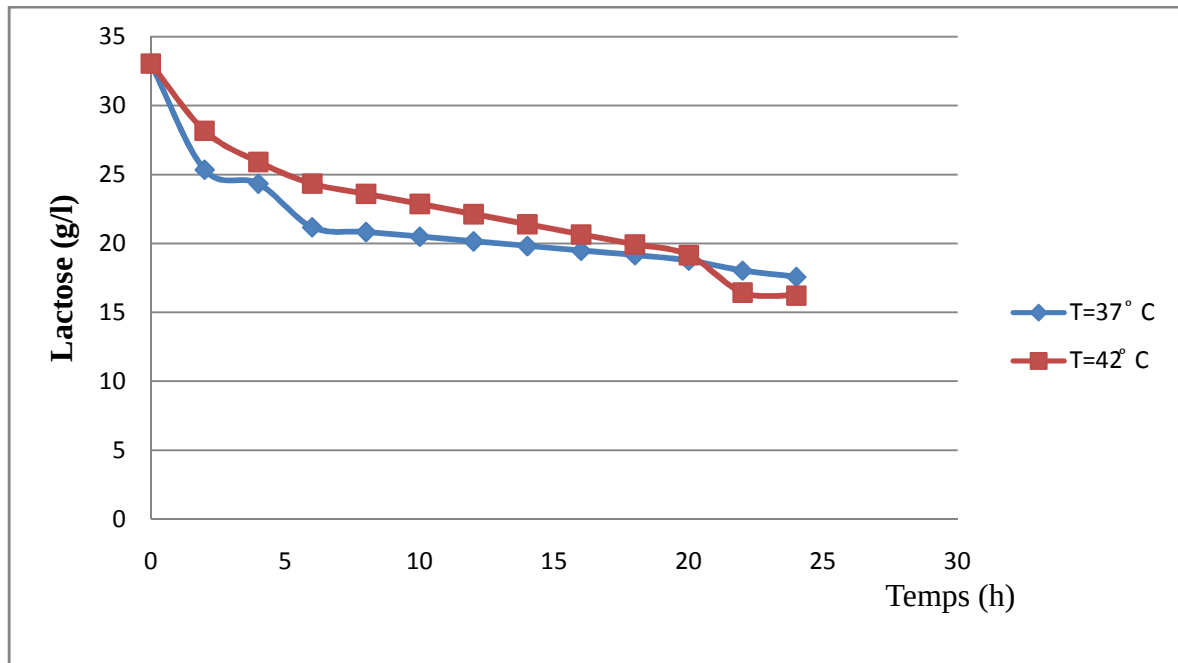


Figure 18 : Evolution de la concentration de lactose en fonction du temps à différentes températures

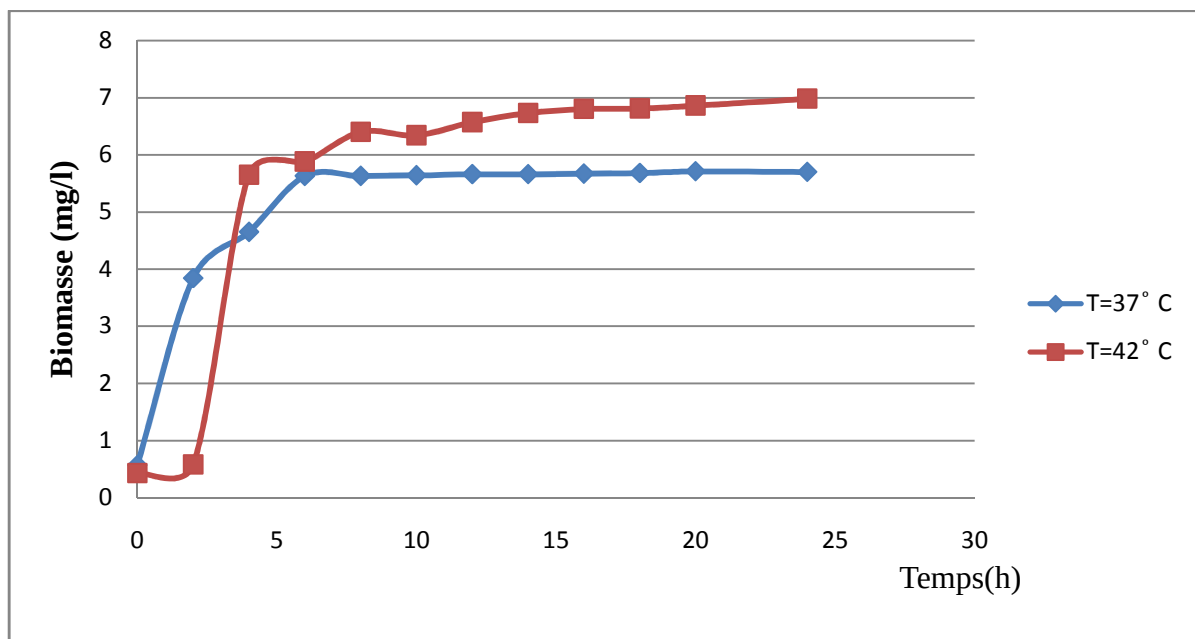


Figure 19 : Evolution de la biomasse en fonction du temps à différentes températures et à pH constant.

Résultats et discussion

3.3.1.2. Effet du pH

Comme la température, le pH est un facteur qui influe très significativement la croissance bactérienne.

Selon les données bibliographiques l'espèce *Streptococcus thermophilus* préfère une gamme de pH comprise entre 6 et 6,5 (Beal et Corrieu, 1991).

Les conditions du déroulement des fermentations en variant le pH sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau IV: Conditions opératoires concernant l'optimisation du PH

Paramètres variables	Paramètres constants
pH= 5 ,5 pH=6 pH=6 ,5	Température : 42°C Milieu de culture : 150 ml Préculture : 15 ml Taux d'inoculum : 10% Temps d'incubation : 24h Sans agitation



Figure 20: Aspect de la culture bactérienne après 2 heures de fermentation à des pH différents (5,5 ; 6,0 ; 6,5).

Résultats et discussion

Les figures (21, 22, 23, 24) représentent respectivement l'évolution de l'acide lactique, le lactose, le pH, la biomasse aux pH étudiés en fonction du temps et à température constante (42°C).

Selon la figure (22) on remarque une meilleure production en acide lactique (6 g/l) à pH 6,5 comparativement aux résultats obtenus aux pH 5,5 et 6 (5 g/l et 5,5 g/l, respectivement).

La fermentation lactique par *Streptococcus thermophilus* s'effectue par la voie homofermentaire au cours de laquelle 90% du lactose est transformé en acide lactique. D'après la figure (23), le lactose est dégradé rapidement par la souche utilisée. Le produit ainsi obtenu (acide lactique) à la fin de cette dégradation provoque l'abaissement du pH.

De façon générale, le lactose est converti en acide lactique par la voie d'EMBDEN MEYERHOF qui forme deux molécules de lactate par molécule de lactose consommé (Luquet et Corrieu, 2005).

Les figures (22) et (24) montrent que la croissance ainsi que la production d'acide lactique diminuent à un pH bas 5,5. (10,2mg/l) pour la biomasse et de (5g/l) pour l'acide lactique, tandis qu'il y a augmentation de la biomasse (11,2mg/l) et de l'acide lactique (6g/l) avec l'élévation du pH (6,5)

Il est connu, qu'à des pH bas, l'acide lactique provoque une pression dans les cellules microbiennes (Vali et al., 2006) ou les bactéries perdent leur activités physiologiques entraînant ainsi une inhibition de β -galactosidase et d'autres enzymes de glycolyse.

McBean et al. (1979) ont trouvé que le pH 6 est adéquat pour *Streptococcus thermophilus* par contre Tayeb et al. (1984) ont adapté un pH de 6,5 pour la même espèce. Les résultats des travaux de Hutkins et Nannen (1993) ont montré que le pH optimum pour les bactéries lactiques thermophiles et plus précisément *Streptococcus thermophilus* se situe entre 6 et 7,5.

Selon Boudjema K. (2008), le pH optimum pour la croissance de *Streptococcus thermophilus* est de 6,42 où la production du lactate atteint 10g/l au bout de 12h de fermentation.

Les bactéries lactiques thermophiles telles que le *Streptococcus thermophilus* poussent et gardent leur viabilité dans des milieux où le pH est compris entre 4,5 et 7.

Résultats et discussion

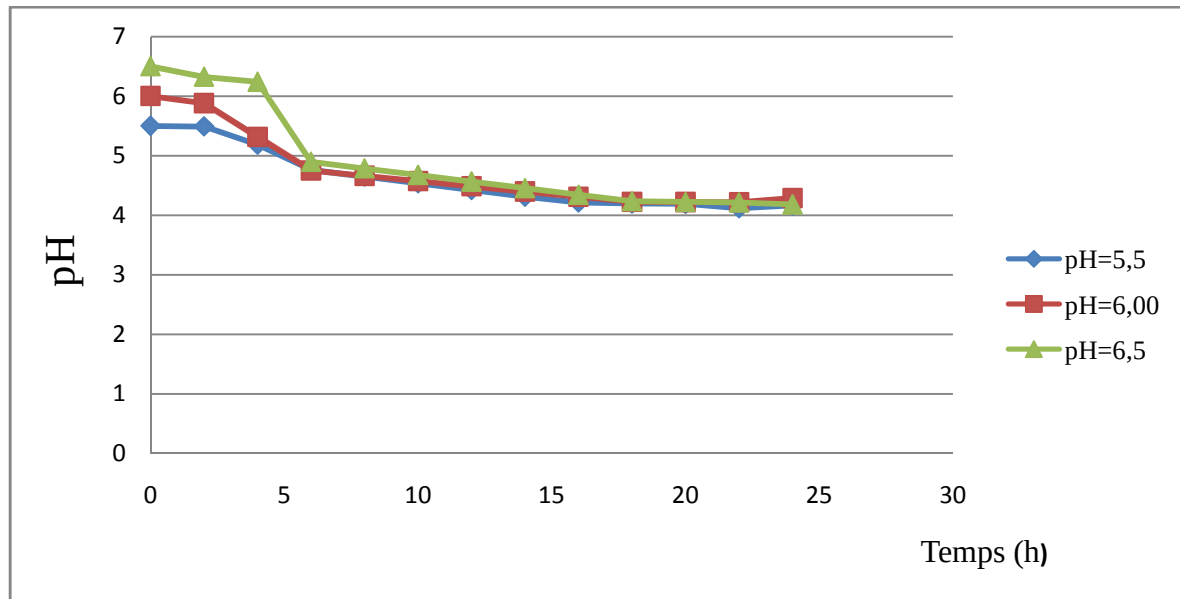


Figure21: Evolution du pH en fonction du temps à différents pH et à T =42°C

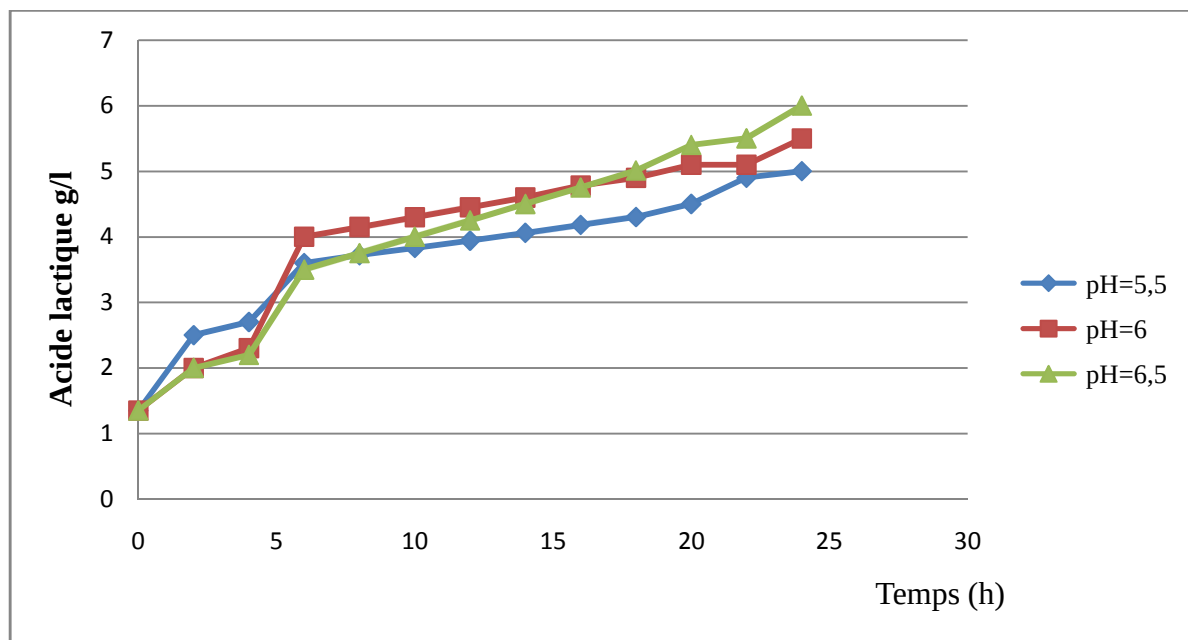


Figure22 : Evolution de la concentration en acide lactique en fonction du temps à différents pH et à T =42°C

Résultats et discussion

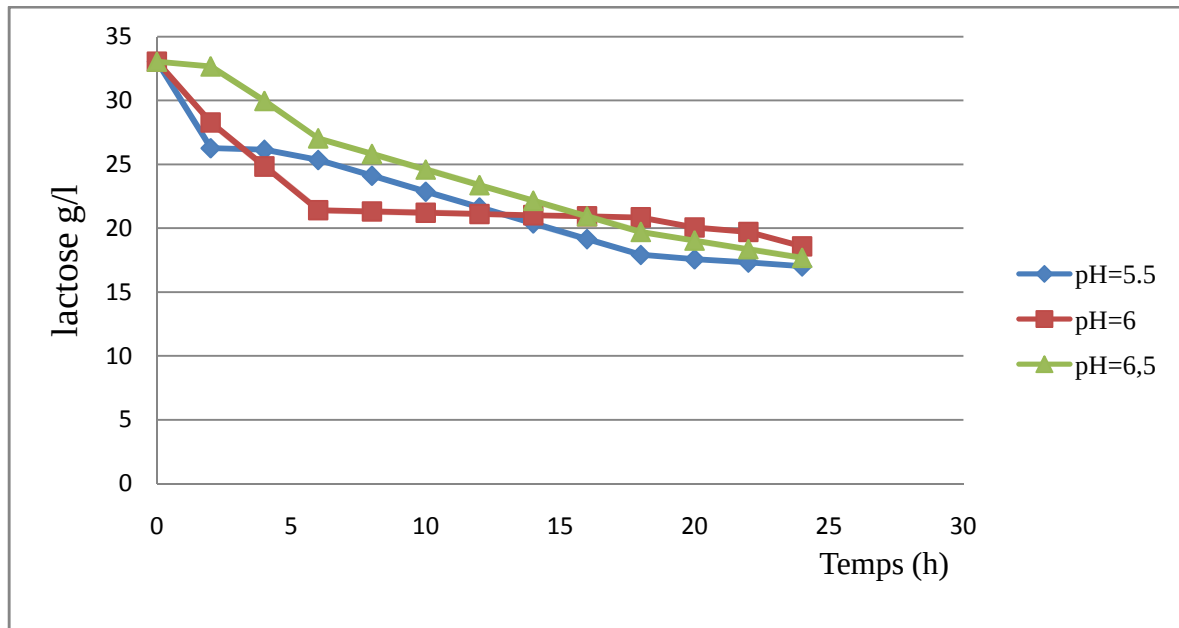


Figure23 : Evolution de la concentration en Lactose en fonction du temps à différents pH et à T =42°C

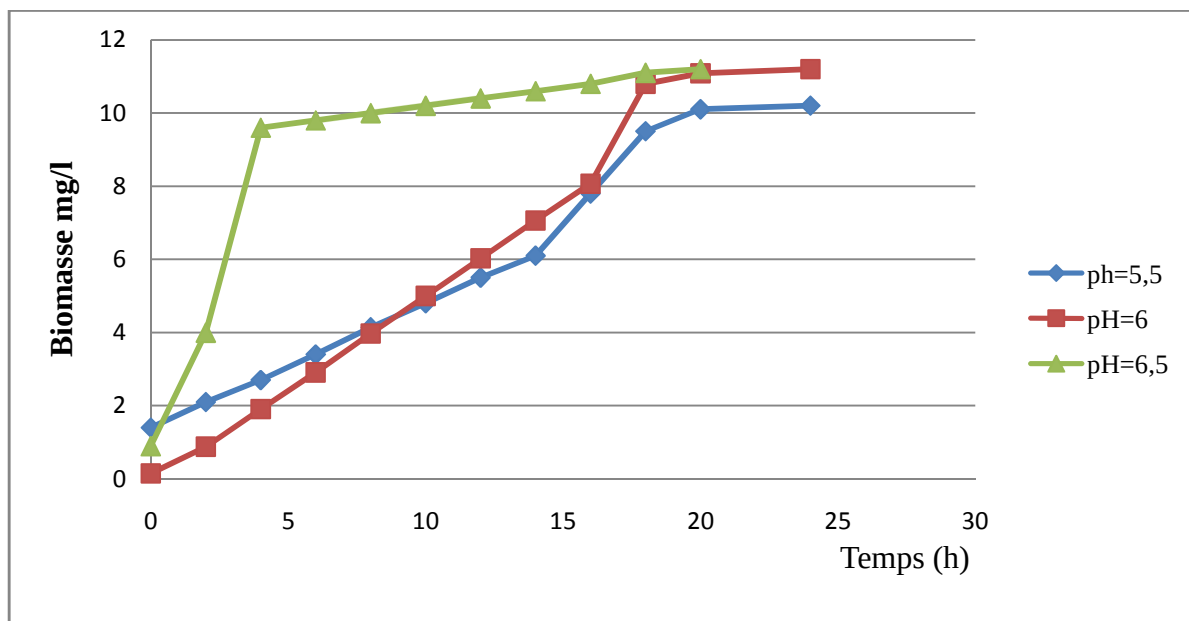


Figure24 : Evolution de la concentration de la biomasse en fonction du temps à différents pH et à T =42°C

Résultats et discussion

3.3.1.3. Effet de la variation du taux d'inoculation

Nous avons procédé à trois fermentations avec différents taux d'inoculation (10% , 15% , 20%) (Tableau V).

Tableau V: Conditions opératoires concernant l'optimisation de la concentration d'inoculum

Paramètre variable	paramètre constant
Inoculum (%)=10%	Température : 42°C
Inoculum (%)= 15%	Milieu de culture : 150 ml
Inoculum (%) =20%	PH : 7
	Temps d'incubation : 24H
	Sans agitation



Figure 25 : Aspect de la culture bactérienne après 2 heures de fermentation à des taux d'inoculum différents

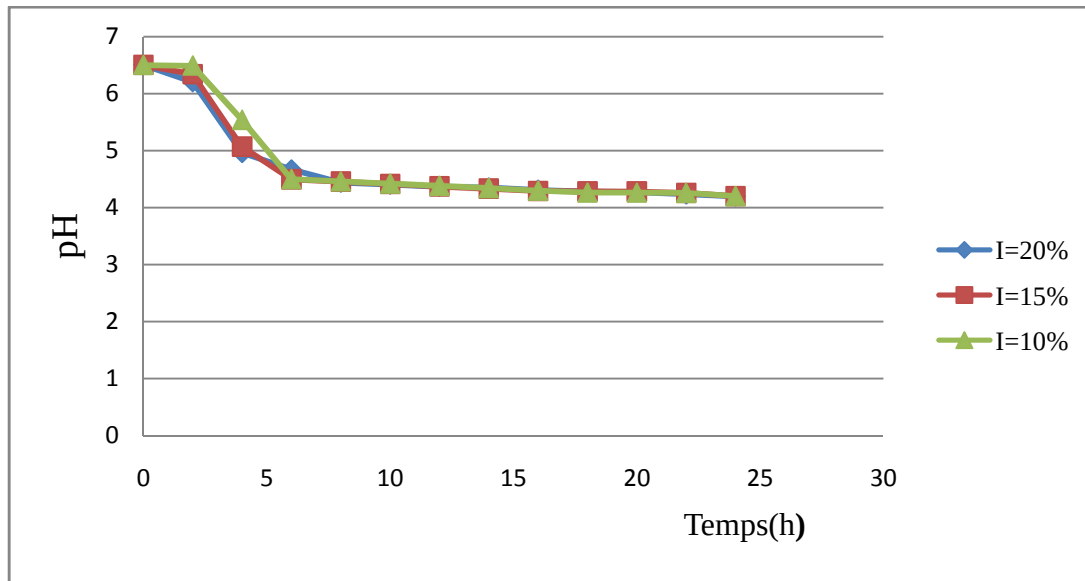


Figure 26 : Evolution du pH en fonction du temps à différents taux d'inoculation et à température de 42°C.

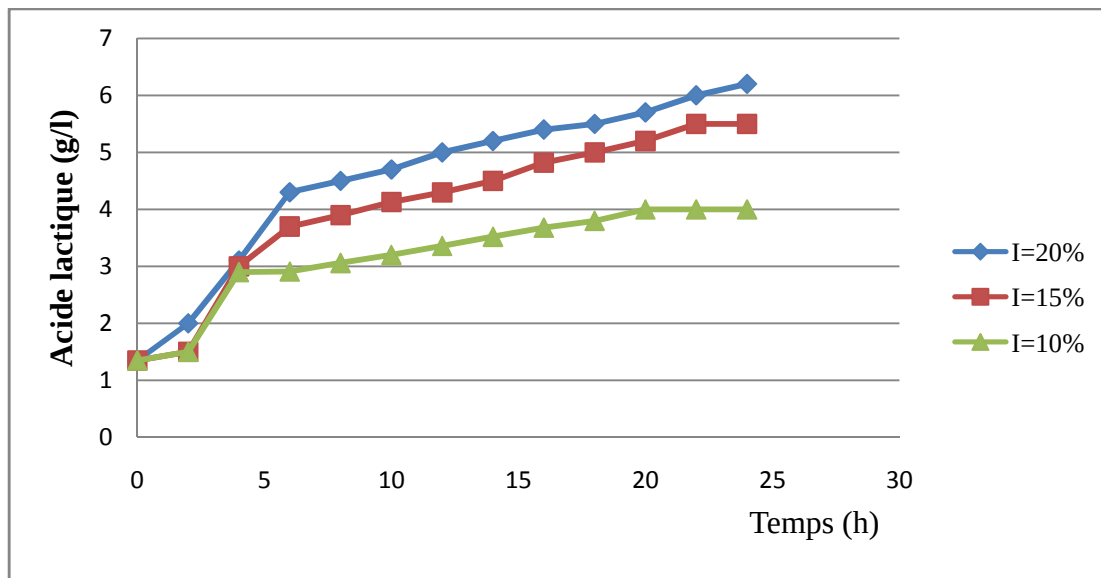


Figure 27: Evolution de la concentration en Acide lactique en fonction du temps et taux d'inoculum différents

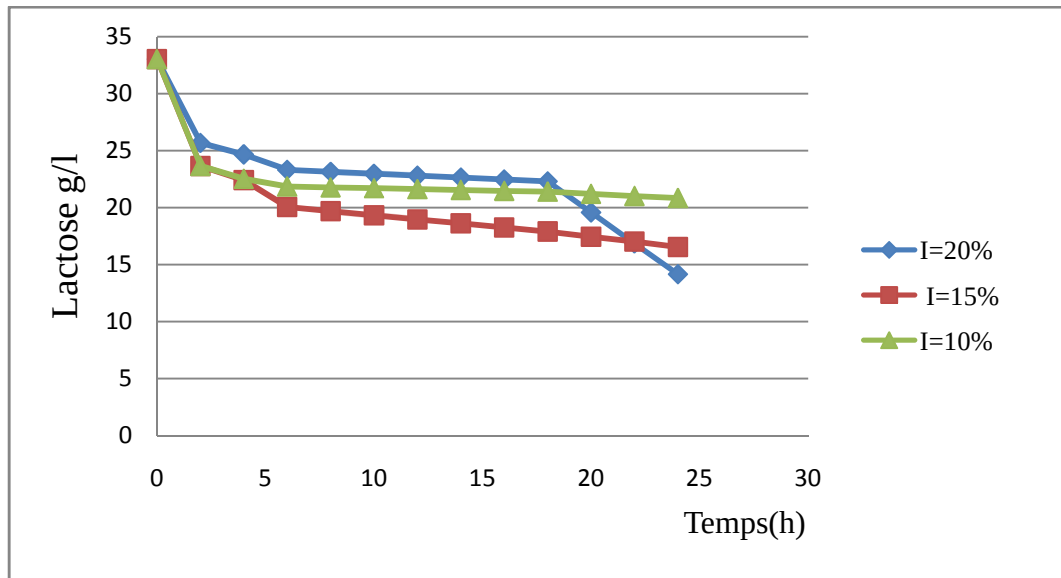


Figure28 : Evolution de la Concentration en lactose en fonction du temps à taux d'inoculum différents et à T =42°C

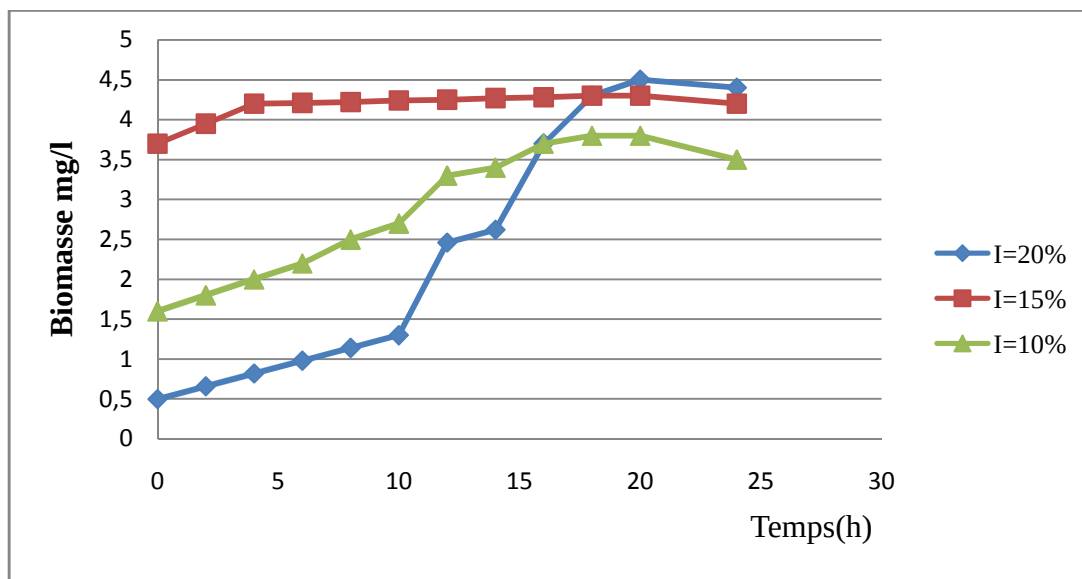


Figure29: Evolution de la Biomasse en fonction du temps et taux d'inoculum différents

Résultats et discussion

Les figures (26,27,28, 29) représentent respectivement l'évolution de l'acide lactique, lactose, pH, biomasse. A des taux d'inoculum différents (10%, 15% et 20%), en fonction du temps, et à température constante.

Selon la figure (27), on remarque une meilleure production en acide lactique (6,2 g/l) à un taux d'inoculation égal à 20% comparativement aux résultats obtenus aux taux de 15% (5,5g/l) et 10% (4g/l).

On déduit que plus le taux d'inoculum est élevé (20%) plus le rendement en acide lactique obtenue est élevé (6,2 g/l) et cela est dû à la diminution de la phase de latence et au rallongement de la phase d'accélération vue la richesse de la culture en substrats nutritifs ainsi que l'inoculum.

Les résultats de Reddy et *al.* (1976), Vahvaslka et Linko (1987) et Amrane (1991) montrent que la phase de latence diminue quand la taille d'inoculum augmente. Belhocine (1987) a constaté que les performances de la fermentation s'améliorent lorsqu'on multiplie le repiquage.

Conclusion

Conclusion

Le développement de nouvelles technologies pour la valorisation du lactosérum est nécessaire, surtout que les quantités produites par les fromageries ne cessent d'augmenter au fil des années. Cela va servir d'une part à limiter le problème de pollution environnementale engendrée par ce sous-produit, d'autre part à synthétiser une large gamme de produits qui trouvent différentes utilisations.

Notre étude s'est intéressée à la valorisation du lactosérum comme substrat de fermentation pour la production de l'acide lactique par une souche de *Streptococcus thermophilus* que nous avons isolé du yaourt.

Les analyses menées au laboratoire ont porté sur l'analyse de la qualité physico-chimique du lactosérum doux provenant de la fabrication du camembert (dosage du lactose, EST, Matière grasse, protéines, mesure de pH et d'acidité.) ; ainsi que des essais de fermentation ont été entreprises sur du lactosérum stérilisé par tyndallisation dans différentes conditions (pH, Température et taux d'inoculation).

Les résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum ont montré que ce dernier peut être utilisé comme substrat de fermentation, les teneurs en différents nutriments sont comme suit : matière grasse (4,3g/l), protéines (5,8g/l), lactose (33,3g/l).

Les essais de fermentation qui ont été menés afin d'optimiser les conditions de la culture ont mis en évidence la possibilité de cultiver la souche de *Streptococcus thermophilus* sur ce substrat avec un taux d'inoculation (20%), à une température de croissance de 42°C et à pH 6,5. Dans ces conditions, nous avons obtenu une teneur en acide lactique qui avoisine 6,2g /l.

Ce travail n'est qu'une initiation à la thématique sus-citée, cependant, il est nécessaire de le compléter en entreprenant d'autres essais :

- tester d'autres méthodes d'analyses (pour le dosage de l'acide lactique, l'estimation de la biomasse) ;
- calculer les rendements en acide lactique produit ;
- tester d'autres paramètres pour la réalisation des fermentations.

Références bibliographiques

Références bibliographique:

- **Accolas J.P., Hemmed., Desmazeaud M.J., Vassel I., Bouillance C et Veaux MC. 1980-** Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. *Lait*, 60: 487-254.
- **AFNOR(1980).** recueil des normes françaises. Laites et produits laitiers.
- **Agnes N. 1986-** Production des protéines à partir de lactosérum brut. Thèse de 3eme cycle, université de Lyon, France.
- **Amariglio S. (1986)** .Contrôle de la qualité des produits laitiers : analyses physico chimique. 3^{eme}ed .AFNOR, Paris.
- **Amrane A. 1991-** Optimisation de la productivité d'un fermenteur effectuant la conversion en acide lactique de permeat de lactosérum supplémenté. Thèse de doctorat, Université de Rennes I –France, 152p.
- **Audic J. C, Chaufer B., Daufin G., 2003.**Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. 83: 417 - 438.
- **Awad S., HassanA.N., and Muthukumarappan K. 2005-**Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Texture and melting properties. *Journal of Dairy Science* 88: 4204-4213.
- **Beal C et Corrieu G ., 1991** .Influence of Ph ,Temperature and inoculums composition on mixed culture's of *Streptococcus Thermophilus* 404 and *Lactobacillus B ulgaricus* 398N.*Bioltechnology and bioengineering*1 :90 -98.
- **Belhocine D ., 1987** .Etude de valorisation de lactose par fermentation lactique. Thèse de doctorat en microbiologie de l'université Nancy I , France 121p.
- **Bergey D. H., J. G. Holt et Krieg N.R. 1984-** Bergey's manual of systematic - Volume 2. Williams et Wilkins, Baltimore, pp. 1043-71.*Biological Chemistry* 277: 32-39.
- **Bergel A B., Quinquis P., Renault A. Sorokin S D., Ehrlich S., Kulakauskas A. Lapidus E., Goltsman M. Mazur G D., Pusch M., Fonstein R., Overbeek N., Kyprides B., Purnelle D., Prozzi K., Ngui D., Masuy F., Hancy S., Burteau M., Boutry J., Delcour A., Goffeau et Hols P. 2004-** Complète séquence and comparative génome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22: 1554-1558.
- **Bolotin A., Delorme C., Ehrlich S D., Guedon E., Monnet W., Renault P and Kleerebezem M. 2005-** New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews.* 29: 435-463.

- **Boudier K. Botofon K., 1979**, Etude de l'activité acidifiante de *Streptococcus salivarius thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* croissance d'un ferment lactique sur lactosérum. Mémoire d'ingénieur en technologie des industries agro-alimentaires, INA, El- Harrach. Alger, 90p.
 - **Boudier K et Luquet N., 1980**, le lait source d'ingrédients performant et versatiles journal of agriculture food , Canada . 1233 -1246.
 - **Botofonja gina K. 1994-** Etude de l'activité acidifiante de *Streptococcus salivarius thermophilus* et *Lactobacillus delbruckii ssp bulgaricus* et croissance d'un ferment lactique sur lactosérum. Mémoire d'ingénieur en technologie des industries agro-alimentaires, INA, El-Harrach. Alger, 90p.
- Boudjema M, 2008**-Essai d'optimisation de la production d'acide lactique sur lactosérum par *Streptococcus thermophilus*, these de Magister Université M'Hamed Bougara , Boumerdès. P 7.
- **Bouraqadi Idrissi Azaddine (2006)**. Extraction par solvant:Etude de modélisation du système Tributyl phosphate – Acide monocarboxylique .Thèse de doctorat Science des Agro ressources, 7-238.
 - **Britten M ;(2003)** .technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires Ed : tec & doc, Lavoisier, Paris, 35:251-263.
 - **Cayot P, Lorient D (2001)** structures et techno fonction des protéines du laits, Tec et Doc Lavoisier, Paris, 363p, 7.
 - **Chamba J ;F ., 1990** .pas de piston pour les bactéries lactiques thermophiles .Revue laitières française 492 :47-50.
 - **Chamba J ; F et Prost F. 1989, Mesure** de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles pour la fabrication des fromages à pates cuites, Lait 69 : 417 -431.
 - **Champagne C.P., Girard F., Rodrigue N. 1993-** Production of concentrated suspensions of thermophilus lactic acid bacteria in calcium alginate beads. International Dairy Journal, 3:257-275.
 - **Chandan R. 2006-** Manufacturing yogurt and fermented milks. Blackwell Publishing.8, 26-33.
 - **Datta R, Tsai S-P, Bonsignore P., Moon S-H, Frank J.R. 1995-**Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology journal, 35(1981), 47-64.
 - **Dellaglio F., De Rossart H., Torrianis S., Curk M. et Janssens D. 1994-** Caractérisation générale des bactéries lactiques. Tec et Doc (Eds), Lorica, 1, 25-116.

- **Delobette J.B. et Ormerod O.J 1991.** Mise au point de procédé de traitement des lactosérum et effluents de fromageries en production fermière .Compte rendu sur les techniques d'élevage et qualité Institut d'élevage .INRA.
- **Desmazeaud M. 1990**-Lait milieu de culture, microbiologie, aliment, nutrition, 8: 313-325.
- **Fanworth,E , et Mainville,I ,(2010)** ,les produits laitiers fermenté et leurs potentiels thérapeutiques ,centre de recherche et de développement sur les aliments ,industrielle du petit lait et de son permeat par fermentation. Thèse de doctorat, école International Dairy Fed. Nutrition News, 5:23-24.3:179–184.
- **Food and Drug Administration (F.D.A) .(1982)** . 184.1061 Diacétyl .Registre des produits Gras page 184.1063.
- **Gana S. et Touzi A. (2001).**Valorisation du lactosérum par production de levures lactiques avec les procédés de fermentation discontinue et continue .Rev . Energ .Ren : production et valorisation –Biomasse, 5158.
- **Givry sébastien (2006).**Optimisation de procédé de fermentation lactique sur sirop de son blé et purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de Lactobacillus bifementans. Thèse de doctorat .UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE – ARDENNE , Laboratoire de Microbiologie Industrielle , UMR FARE 614 , INRA ,9-14.
- **Gonzfilez Siso M. I., 1996.** The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, 57, 1: 1-11.
- **Hofvendahl K et Hahn-Hägerdal B. 2000-** Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology, 26, 2, 87-107.
- **Hogg T. 2005-** Essential microbiology. John Wiley & Sons, Ltd. 188-190.
- **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Decaris B.,Herve-Jimenez L., Guillouard I., Guedon E., Gautier C., Hols S., Monnet V., Rul F., and Maguin E. 2005 -** Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8: 4273-4286.
- **Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U.2001-** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of probiotic microorganisms in food and nutrition. American Journal of Clinical Nutrition, 73:365S-373S.
- **Huntkins R ;w and Nannen N ;L . , 1993 .**Ph Homostasis in lactic and bacteria J, Journal of dairy science 76 :2375.
- **Jarry A. 1994-** Production industrielle d'acide lactique : les bactéries lactiques T1, Ed Lorica, Lavoisier, Paris, 604p.

- **Klaenhammer T E., Altermann F., Arigoni A., Bolotin F., Breidt J., Broadbent R., Cano S., haillon J., Deutscher M., Gasson M., van de Guchte J., Guzzo A., Hartke T., Hawkins P., Hols R., Hutkins M., Kleerebezem J., Kok O., Kuipers M., Lubbers E., Maguin L., Mckay D., Mills A., Nauta R., Overbeek H., Pel D., Pridmore M., Saier D., van Sinderen A., Sorokin J., Steele D., O'Sullivan W., De Vos B., Weimer M., Zagorec., et Siezen R. 2002-** Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 29-58.
- **Lamoureux L. 2000.** Exploitation de l'activité β - galactosidase de culture de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. Mémoire de maîtrise, Université de Laval, Canada.
- **Linden G et Lorient D 1994**–biochimie agro industrielle, valorisation alimentaire de la production agricole Masson Paris Milan Barcelone.
- **Lipinski E.S et Sinclair R.G. 1986-** Is lactic acid a commodity *Chemical Engineering Progress*, 82, 8, 26-32.
- **Lowry O.H., Rosebrough N .J., Farr A.L et Randall R.J (1951)** .protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265, 275.
- **Luquet et Francois M. 1990**-lait et les produits laitiers, vache, brebis, chèvre. Tome II. Techniques et documentation- Lavoisier, 621p.
- **Luquet M et Corrieu G ., 2005.**Bactéries lactiques et probiotiques ,Lavoisier ,Paris ,442p.
- **Marwaha E. 1988-** Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* 8: 4273-4286.
- **Mc bean R.D ., Hall et Linklater P.M ., 1979.**Modélisation et fermentation lactiques in : Les bactéries lactiques T2 : Aspect fondamentaux et technologique Ed Lavoisier p614.
- **Mc Sweeny P,L,H,Salaunn –Mechel ;F.'(2004)** ,Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening a review,*Laits*,80, 293-324.
- **Mereo M., . (1971)** les utilisations industrielles du sérum de fromagerie pp :817-823. *Microbiology*, 56:449-452.
- **Mirdamadi S . , Sadeghi H .,Sharafi N., Fallahpour M., Mohsni F.A et Bakhtiari M.R ., (2002).**Comparison of lactic Acid Isomer's produced by Fungal and Bacterial Strains .Iranien Research Organization for science et technology (IROST) ,Dept .of biotechnology ,Tehran ,Iran , *Iranian Biomedical Journal* 6(2) et(3):69- 75 .
- **Moineau S. 1997-** Bacteriophage and phage résistance in *Streptococcus thermophilus* :an islamic academy of sciences ,4: 170-172.

- **Moletta R. 2002-** Gestion des problèmes environnementaux dans les IAA. Paris : Tech et Doc; 600p.
- **Mora D., Maguin E., Masiero M., Parini C., Ricci G., Manachini P.L and Daffonchio D.2004-** Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* 96: 209-219.
- **Morr C.V. and, HA E, Y, W. (1993).** Whey protein concentrates and isolate :processing and Functional properties .Critical reviews in food science and nutrition, 33 (6) Pp431-476.
- **Mota RM., Moreira JLS., Souza MR., Horta M.F., Teixeira S.M.R., Neumann E., Nicoli JR., Nunes A.C. 2006-** Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnology*, 6:1-11
- **Narayanan N., Roychoudhury P.k and Srivastava A. 2004-** L (+) lactic acid fermentation and its product polymerisation.Electronic journal of biotechnology, 2, 7, 167-179.
- **Novel G. 1993-**Les bactéries lactiques *in*: Microbiologie industrielle ; les microorganismes d'intérêt industriel. Ed Technique et Documentation, Lavoisier, 614p.
- **Omar S et Sabry S. 1991-** Microbial biomass and protein production from whey. *Journal of Islamic academy of sciences* ,4: 170-172.
- **Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi DN and Bunko K. 2007-** Bioutilization of whey for lactic acid production.Division of dairy microbiology.National dairy research institute.N°3,pp.1-14.
- **Pascual LM, Daniele MB., Pajaro C., Barberis L. 2006-** *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance.
- **Perrin C., Guimont C., Bracquart P., and Gaillard J.L. 1999-** Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Current Microbiology* 39: 342-347.
- **Poget-Ramscier C. 1993-** Production d'acide lactique et acétique en vue d'une valorisation industrielle du petit lait et de son permeat par fermentation. Thèse de doctorat, école polytechnique fédérale de Lausanne.
- **Reddy H.G., Henderson M et Erdman M.D., 1976.**Bacterial fermentation oh cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein ,32: 141-172.
- **Rojan P .J ,Sukumaran R . K., Madhavan NappoothiriK ., Pandey A . (2007) .** Statistical optimization of simultaneous saccharifaction and L (+) – Lactic acid fermentation

from cassava bagasse using mixed culture of lactobacillus by response surface methodology. Biochemical Engineering Journal 36 :262 – 267 , Elsevier B.V.

- **Rosson L ., Lobry J R , B ajard and F landrois J P ., 1995** ,Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth .Applied and environmental microbiology ,61 ;601-6.
- **RousselY., Pebay M., Guedon G., Simonet J.P and Decariss B. 1994-** Physical and genetic map of streptococcus thermophilus A054. Journal of Bacteriology, 176(24), 7413-7422.
- **Schleifer K.H., Ehrmann M., Krusch U etNeve H. 1991-** Revival of the species *Streptococcus thermophilus*.System. Appl. Microbiol. 14: 386-388.
- **Schultermandl F et Imdorf A. 2002-** Aérosol à l'acide lactique pour le traitement contre le verroa destructor.D **Review**, 16:221–231.
- **Smith B.R., R.D. McBeanet G.C. Cox. 1977-** Separation of lactic acid from lactose fermentation liquors by reverse osmosis. Australian Journal of Dairy Technology, 77, 23-25.
- **Solis G., C. G. de Los Reyes-Gavilan, et al. 2010-** "Establishment and development of lactic acid bacteria and bifido bacteria microbiota in breast-milk and the infant gut." Anaerobe 16(3): 307-10.
- **Sottiez P(1990),;** produit dérivés des fabrication fromagères, lait et produit laitiers ,tome 2.Ed :Lavoisier ,paris pp357-392.
- **Sreenath H., Moldes A., Koegel R., Straub R. 2001-** Lactic acid production from agriculture residues. Biotechnology Letters,*Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*.29: 435-463 .
- **Sun Z., Chen X, et al. 2011-** "Complete genome sequence of *Streptococcus thermophilus* strain ND03." J Bacteriol 193(3): 793-4.
- **TayebJ ., Bouillance C and Desmazeaud M,J .1984 .** Comparaised control of lactic acid bacteria . journal of fermentation technology 62 : 5461 – 470.
- **Techobanoglous G ; 1979.**Waste water enginneng :Traitement ,disposal,Reuse 2nd ED ,New York :McGraw –hill update. 34th Marschall italian and speciality cheese seminar.
- **Vahvaselka MI and Linko P ., 1987.** Lacticacid fermentation in milk ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* ..proceeding of the 4th European congress of biotechnological,3:317-320 , Elsevier,Amsterdam.
- **Vali M ., S auer M ., B randauraddi P ., Borth N ., Porro D and M attanovich D 2006,** I mprovement of lactic acid production in *Saccharomyces Cervisia* by cell Sorting for height intracellular Ph . Appllied and enviremmmental microbiology ,5492 – 5499

- **Vandamme P., Gillis M., de Vos P., Kersters K. and Swings J. 1996-** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60 (2), 407-438.
- **Vick Roy T.B. 1985-** Lactic acid. In : Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3. New York :Pergamon Press, p. 761-776.
- **Visser R.A., Nan den Bos M.J. et Ferguson W.P. 1988-** lactose and it chemical Derivates. bults of I.D.F, n°233, pp:33-44.
- **Vrignaud Y., (1983).** valorisation du lactosérum, une longue histoire revue laitière française n°422,pp :41-46 .
- **Woo A., 2002** .La grande diversité du lactosérum .Agriculture et Agro Alimentaire Canada ,p3 -13.
- **Wee N and Kelly J.M. 2006-** Production of lactic acid from renewable materials Proceeding of the 4th European congress on biotechnology, Elsevier –Amsterdam 3 :317 -320.
- **Yang J et Silva K., (1995).** Biotechnological Production of lactic Acid and Its Recent Application .Biochem .Biotechnal ., 1-10.

Annexes

❖ **Annexe 1 :**

Détermination de l'acidité titrable du lactosérum :

- Dans un bécher, on introduit 10ml du lactosérum prélevé à l'aide d'une pipette ;
- Ajouter 2 à 3 gouttes de la solution de phénophtaléine à 1% ;
- Titrer par la solution d'hydroxyde de sodium (0,111 N) jusqu'au virage au rose, facilement perceptible par comparaison au témoin constitué du même lactosérum ;
- 1ml de NaOH versé correspond à 0,1 g /l de l'acide lactique, et le résultat est exprimé en (°D) où °D= 0,1 g d'acide lactique par litre du lactosérum ;

❖ **Annexe2 :**

Détermination de l'extrait sec total (EST) :

- Dans une capsule séchée et tarée, à l'aide d'une pipette peser 3 g du lactosérum homogénéisé sous forme de gouttelettes bien répartie ;
- Introduire la capsule dans le dessiccateur infra rouge réglé à 105 °C ;
- Laisser chauffer pendant 20 minutes ;
- L'extrait sec est lu directement sur l'afficheur du dessiccateur ;
- Le résultat est multiplier (**x10**) pour obtenir le poids net en **g /l**.

❖ **Annexe3 :**

Détermination de la teneur en matière grasse par la méthode acido-butyrométrique de GERBER :

- Introduire 10ml d'acide sulfurique ($d=1,83$) dans le butyromètre de **GERBER** ;
- A l'aide d'une pipette, prélevé 11 ml du lactosérum à analysé, puis les versé dans le butyromètre sans mouiller le col de celui –ci ;
- On ajoute 1ml d'alcool isoamylique ;
- Bien boucher le butyromètre, agiter et retourner afin de bien dissoudre les protéines ;
- Placer immédiatement le butyromètre dans la centrifugeuse 6minute à 1200 tours/mn ;
- Maintenir verticalement le butyromètre, ajuster le bouchon pour amener la colonne de matière grasse dans la zone de l'échelle .Lire le résultat ;
- La teneur en matière grasse est exprimée en **g/l**.

❖ **Annexe 4 :**

Dosage du Lactose en utilisant l'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS) :

- Mettre 1ml de la solution a doser (ou des différents dilutions) dans un tube a essai ;
- Ajouter 2ml du réactif (3,5DNS) ;
- Chauffer au bain –marie bouillant pendant 5minute ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer pendant 15min a température ambiante ;
- Faire la lecture a 530nm contre le blanc.

NB : afin de déterminer la quantité de glucose présente dans les solutions inconnues, il faut réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de glucose 0.5g/l.

Gamme étalon :

N° de tube	01	02	03	04	05	06
Solution de glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactifs DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

-Traiter les tubes de la même façon que précédemment : étapes de 3 à 7

-Tracer la courbe étalon $DO=f(\text{concentration en glucose})$ et déterminer la quantité de glucose présente dans la solution inconnues .

❖ Annexe 5

Dosage des protéines par la méthode de **Lowry et al (1951)** :

1. Préparation des solutions :

Solution A : Na_2CO_3 anhydre 2% dans NaOH 0,1M ;

Solution B : 2ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% + 2ml de tartrate de Na et K, 1%

Solution C : 50ml A + 1ml B

1. 2. Gamme étalon (solution témoin)

$\mu\text{g/ml}$	0	30	50	80	100
Solution mère d'albumine sérique bovine (BSA) (μl)	0	300	500	800	1000
Eau distillée (μl)	1000	700	500	200	0

1.2.2. Réaction et mesure de l'absorption :

A 0,5 de la solution d'échantillon contenant entre 25 et 100 μg de protéines :

-Ajouter 2,5ml de la solution C et mélanger ;

-Laisser 5 à 10min à température ambiante ;

-Ajouter 0,25ml de réactif de Folin –Ciocalteu ;

-Homogénéiser rapidement et mettre les tubes 30min à l'obscurité ;

-Après 30min, homogénéiser les solutions rapidement et lire la DO à 750nm ;

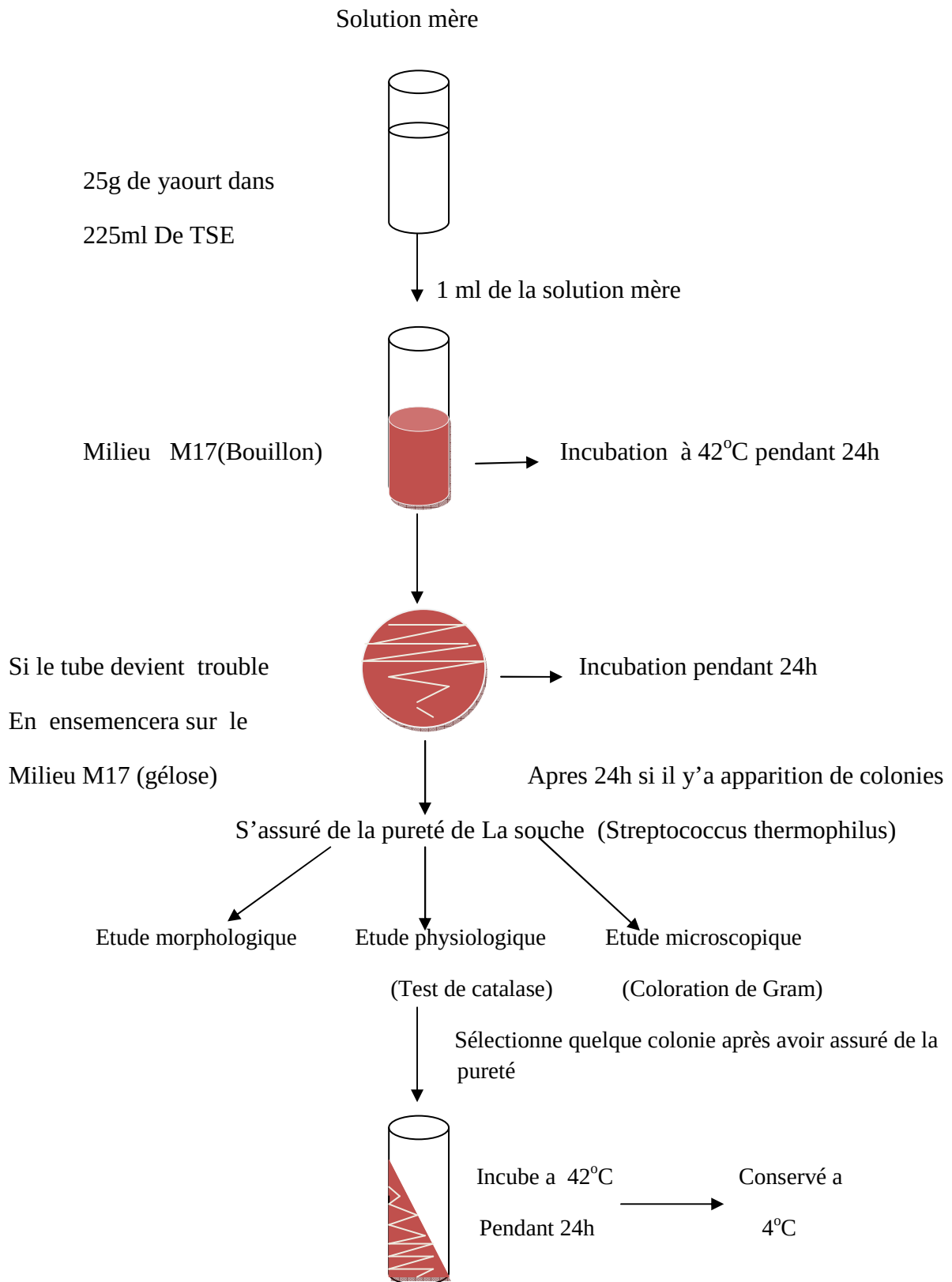
1.2.3. Détermination des teneurs protéiques :

1. Tracer la courbe étalon : $\text{DO} = f(\text{concentration de protéine standard : BSA})$;

2. déterminer à partir de cette courbe les teneurs en protéines des échantillons

❖ Annexe 6

Préparation des tubes de conservation :



Préparation des tubes de conservation

❖ **Annexe 07 :**

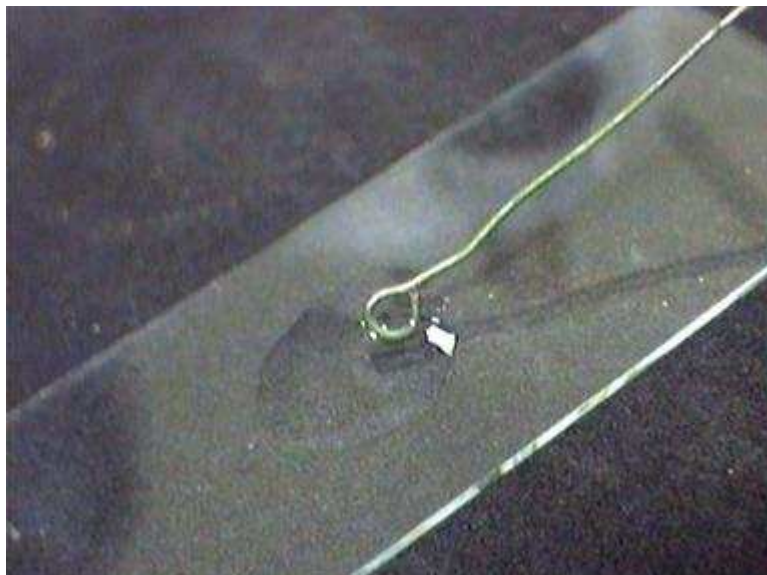
Teste de Catalase

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée



Prélever dans la zone d'asepsie une colonie à l'anse de platine.

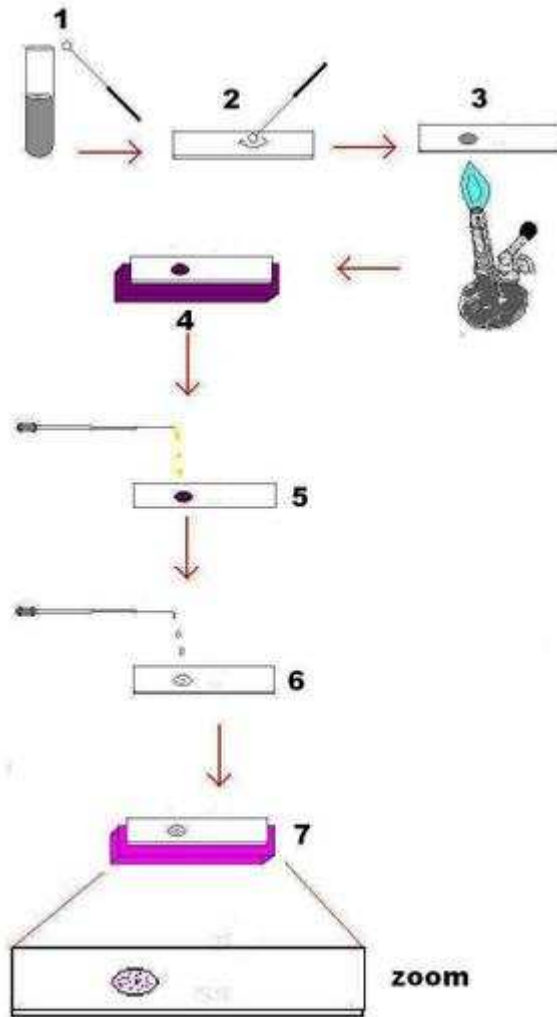
Déposer la colonie dans la goutte d'eau oxygénée.



Si il y'a apparition de bulles d'oxygène donc la souche est dite Catalase (-) le contraire est catalase (+)

❖ Annexe 08:

La coloration de gram :



1- On réalise un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: on agite la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en la passant sous le bec benzène), on prélève un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de la anse dans le tube à essai.

2- On dépose ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.

3 -On procède à la fixation du frottis flambé le dos de lame puis la retourné et la faire passé 5 fois sur la flamme du bec Bunsen.

4- La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 1 minute dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau courante.

5- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 45 secondes. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.

6 -Décoloration à l'alcool: Recouvrir la lame d'alcool et laissé agir 30 secondes puis rincer abondamment a l'eau courante pour arrêter la décoloration. La lame doit être claire à la fin de la décoloration. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

7 -Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: Recouvrir avec la Fuchsine ou la safranine et laisser agir 1 minute. Laver a l'eau courante. Sécher la lame

❖ **Annexe 09:**

Préparation de la culture :

300ml de lactosérum + 30ml de la préculture $\Rightarrow$ dans l'ermenmeyer

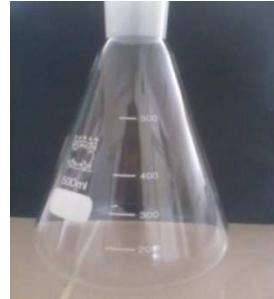
Introduire aseptiquement



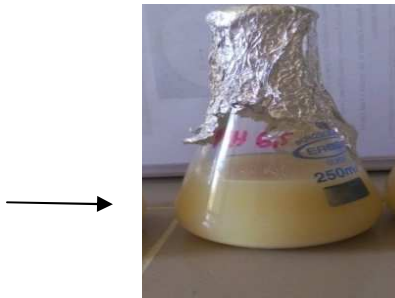
Le Lactosérum



La Préculture



Erlenmeyer de 500ml



La Culture

❖ **Annexe 10**

Mesure de la biomasse microbienne :

- prélève 20ml de notre échantillon
- centrifuge et élimination du surnageant
- récupère le culot
- faire un lavage (dissoudre le culot dans l'eau distillée)
- centrifugé une autre fois
- versé la quasi-totalité du surnagent et dissoudre le culot avec la petit volume du surnagent
- Pesée, poids (**m1**)
- séché dans une étuve réglé a une température de 106-110 °C pendant 16 heures .
- pesée, poids (**m2**)
- détermination de la biomasse bactérienne par l'équation suivante :

$$\mathbf{M2 - M1 = mg\ de\ biomasse/unité\ de\ volume}$$