

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION

Partie I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- I. GENERALITES SUR LE LACTOSERUM
- II. GENERALITES SUR L'ACIDE LACTIQUE
- III. GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES
- IV. GENERALITES SUR LA FERMENTATION LACTIQUE
- V. CONCLUSION PARTIELLE

Partie II : PARTIE EXPERIMENTALE

- I. MATERIELS ET METHODES
- II. RESULTATS ET INTERPRETATIONS
- III. DISCUSSIONS
- IV. CONCLUSION PARTIELLE

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

REFERENCES

ANNEXES

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE

<1> : Notation pour webographie

Bactéries : ce sont des êtres unicellulaires microscopiques avec une paroi bactérienne, une membrane plasmique, un cytoplasme et un noyau sans membrane nucléaire. Elles forment un groupe proche du règne végétal.

Culture discontinue : c'est une culture en système clos en erlen ou en bioréacteur dans des conditions physico-chimiques favorables à la croissance du microorganisme étudié. Il n'y a pas d'addition d'éléments nutritifs au milieu de culture pendant la croissance. Et la culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence en nutriment essentiel ou jusqu'à ce qu'une modification importante de l'environnement inhibe la croissance.

DBO : Demande Biochimique en Oxygène, c'est la mesure de la consommation d'oxygène dissous, exprimé en mg/L, en fonction du temps par les microorganismes qui métabolisent les matières organiques dans un milieu considéré.

Enzyme : c'est une protéine qui joue un rôle de biocatalyseur qui facilite une réaction biochimique sans en modifier les produits. Elle agit à faible concentration et elle se retrouve intacte en fin de réaction.

Fermentation : c'est un type de métabolisme convertisseur d'énergie par lequel un substrat est métabolisé sans intervention d'un agent oxydant exogène. Chez beaucoup de bactéries, elle commence par une voie connue sous le nom de glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas.

Lyophilisation : c'est un procédé qui permet de retirer l'eau contenu dans un produit par sublimation afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation.

L'utilisation de la lyophilisation est particulièrement importante dans le cas des bactéries lactiques puisqu'elles sont très sensibles à la chaleur.

Métabolisme : c'est l'ensemble des réactions biochimiques qui se déroulent dans les cellules vivantes : Il y a construction (anabolisme), dégradation (catabolisme) ou modification de molécules, oxydation ou réduction de divers atomes. La plupart de ces réactions font intervenir des enzymes.

PTS : phosphotransferase system

LISTE DES ABREVIATIONS

❖	°C	:	degré Celsius
❖	μ	:	taux de croissance
❖	μm	:	micromètre
❖	ADP	:	adénosine Diphosphate
❖	ATP	:	adénosine Triphosphate
❖	D.O	:	densité optique
❖	DBO	:	demande biochimique en oxygène
❖	EPT	:	eau Peptonée Tamponée
❖	G	:	temps de génération
❖	g	:	gramme
❖	h	:	heure
❖	HPr	:	protéines de couplage énergétique
❖	Kg	:	kilogramme
❖	L	:	litre
❖	ln	:	logarithme népérien
❖	ml	:	millilitre
❖	mM	:	millimolaire
❖	MRS	:	Man Rogosa Sharpe
❖	Mt/an	:	mille tonne par an
❖	NAD	:	Nicotinamide Adenosine Diphosphate
❖	pH	:	potentiel d'hydrogène
❖	PM	:	poids moléculaire
❖	r	:	Indice de réfraction

Liste des abréviations

- ❖ rpm : tour par minute
- ❖ UFC : unité formatrice de colonie
- ❖ V_{mac} : vitesse moyenne d'acidification
- ❖ $Y_{X/S}$: rendement de conversion du substrat en biomasse
- ❖ $Y_{P/S}$: taux de conversion du substrat en produit

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure moléculaire du lactose	4
Figure 2 : Schéma de valorisation et d'utilisation du lactosérum.....	9
Figure 3 : Molécules (D/L) d'acide lactique & Structure tridimensionnelle	11
Figure 4 : Système PTS.....	19
Figure 5 : Système perméase.....	20
Figure 6 : Métabolisme du lactose chez <i>Lactococcus lactis</i>	21
Figure 7 : Variations de la vitesse de croissance en fonction de la température	24
Figure 8 : Influence du pH sur le développement microbien	25
Figure 9 : Courbe de croissance.....	29
Figure 10 : Principe de la culture	36
Figure 11 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre.....	37
Figure 12 : Schéma du principe.....	38
Figure 13 : Méthode de Fehling.....	39
Figure 14 : Volume mensuel du lait converti en fromage entre 2010 & 2011	42
Figure 15 : Témoins lait (BP1).....	43
Figure 16 : Activation des bactéries (BP2)	43
Figure 17 : Isolement par épuisement	44
Figure 18 : Schéma de quelques colonies isolées	45
Figure 19 : <i>Lactococcus lactis</i> sous microscope optique	46
Figure 20 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 0,5\%$	47
Figure 21 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 1\%$	47
Figure 22 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 2\%$	47
Figure 23 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 3\%$	47
Figure 24 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 4\%$	48
Figure 25 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 5\%$	48
Figure 26 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 6\%$	48
Figure 27 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 7\%$	48
Figure 28 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 8\%$	49
Figure 29 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_o] = 9\%$	49
Figure 30 : Récapitulation du lactate, V_{mac} avec S_o variable	50
Figure 31 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 0 rpm	51
Figure 32 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 10 rpm	51
Figure 33 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 15 rpm	51
Figure 34 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 20 rpm	51
Figure 35 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 25rpm	52
Figure 36 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 50 rpm	52

Figure 37 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 75 rpm	52
Figure 38 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 100rpm	52
Figure 39 : Récapitulation du lactate avec Vmac en fonction de l'agitation	53
Figure 40 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =25°C	55
Figure 41 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =30°C	55
Figure 42 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =37°C	55
Figure 43 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =42°C	55
Figure 44 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =45°C	56
Figure 45 : Récapitulation du lactate avec Vmac en fonction de la température	57
Figure 46 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (10%).....	58
Figure 47 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (7,5%).....	58
Figure 48 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (5%).....	59
Figure 49 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (3,5%).....	59
Figure 50 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (1%).....	59
Figure 51 : Récapitulation du lactate avec Vmac en fonction de l'inoculum	60
Figure 52 : Courbe de croissance du <i>Lactococcus lactis</i>	62
Figure 53 : Représentation simple du cycle de vie de lactosérum par fermentation lactique	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lactosérum.....	3
Tableau 2 : Les trois groupes principaux des protéines du lactosérum.....	4
Tableau 3 : Principaux agents pathogènes présents dans le lactosérum	6
Tableau 4 : Les normes de rejet d'effluents aqueux	9
Tableau 5 : Caractéristiques de l'acide lactique	10
Tableau 6 : Principales bactéries lactiques	15
Tableau 7 : Réalisation de la courbe étalon	37
Tableau 8 : Réalisation de la dilution en cascade.....	38
Tableau 9 : Volume du lactosérum avant et après thermoprécipitation.....	42
Tableau 10 : Tableau récapitulatif de l'évolution du lactate en fonction de S_0	50
Tableau 11 : Tableau récapitulatif de l'évolution du lactate avec l'agitation	53
Tableau 12 : Tableau récapitulatif de l'évolution du lactate avec la température	57
Tableau 13 : Tableau récapitulatif de l'évolution du lactate avec l'inoculum	60
Tableau 14 : Valeur moyenne de la D.O avec le milieu inoculé à 1%.....	62
Tableau 15 : Nombre de colonie issu de la culture sur milieu MRS Lactose solide	65

INTRODUCTION

Au cours des dernières années, le secteur industrie a connu une très grande expansion dans le monde grâce aux progrès de la science et de la technologie. L'accroissement du secteur génère une quantité importante de déchets pouvant être à l'origine de différentes sources de pollution environnementale. En fait, de nombreux sous-produits de l'industrie sont déversés dans la nature et constituent de ce fait un facteur de pollution.

A Madagascar, le secteur industrie est aussi affecté par ce phénomène, notamment l'industrie laitière. Elle s'est développée et occupe une place importante dans l'économie nationale. Elle est à l'origine de la production de grande quantité de lactosérum le plus souvent non valorisée et même parfois non traitée.

Or, comme tout secteur d'activité, l'industrie laitière est concernée par le développement durable et doit satisfaire les normes environnementales. Cette dernière est régie par le décret n° 464/2003 portant sur la classification des eaux de surface et fixant les normes de rejet d'effluents aqueux selon le **Ministère de l'environnement et al.** en 2008. [1]

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à la valorisation du lactosérum issu d'une production du fromage «Camembert» provenant de la FROMAGERIE de BEVALALA.

En effet, la richesse du lactosérum en lactose offre de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel il est soumis. Il peut servir de matière première pour diverses technologies. Aujourd'hui, la valorisation en acide lactique par fermentation microbienne constitue la voie la plus attractive selon **DOLLE J.B.**, en 2003. [2]

Encore dans ce sens, l'acide lactique possède plusieurs utilisations dans les industries chimiques, alimentaires et pharmaceutiques dont la plus importante à l'heure actuelle est la fabrication des polymères biodégradables.

De plus, la synthèse chimique d'acide lactique est moins utilisée à cause de ses effets néfastes sur l'environnement. La synthèse chimique ne peut produire que des 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 selon **HOFVENDAHL K. et al.** en 2000. [3]

Quant à la production d'acide lactique par des microorganismes, elle s'est bien développée. Cependant, elle utilise souvent des procédés de fermentation faisant intervenir des substrats relativement onéreux tels que l'extrait de levure et le glucose.

Compte tenu de la situation évoquée plus haut et dans le but de solutionner ou de trouver un équilibre entre la protection de l'environnement et le développement, le thème du présent mémoire est intitulé :

"Contribution à l'optimisation des paramètres de production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* à partir d'un sous-produit laitier : cas du lactosérum".

Ce mémoire est composé de deux parties : La première est consacrée à une analyse bibliographique, la deuxième est dédiée à l'étude expérimentale où l'on met l'accent sur l'optimisation des paramètres de production d'acide lactique tels que la concentration initiale en substrat, l'agitation, la température et la quantité de l'inoculum en étudiant les paramètres de croissance.

PARTIE I :

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE LACTOSERUM

Dans le processus de fabrication du fromage, le lait est séparé en deux composés : le caillé, matière semi-solide qui deviendra le fromage, et le lactosérum. Ce dernier est donc un sous-produit de l'industrie du fromage et fait l'objet de notre étude de valorisation. <1>

1.1. Définition

1.1.1. Lactosérum

C'est le liquide assez clair, de couleur jaunâtre, qui est retiré du caillé après la coagulation du lait dans la fabrication du fromage. La coagulation est principalement obtenue par l'action d'enzymes de type présure. Il est connu aussi sous le nom de petit-lait ou sérum. Il représente environ 90% de la masse originale du lait servant à la fabrication du fromage. [4]

1.2. Classification

En fonction de la matière première utilisée dans la coagulation du lait par la coagulation enzymatique (présure) ou par l'acide, et selon l'acidité inférieure ou supérieure à 1,8 g/L d'acide lactique, on distingue deux catégories de lactosérum. Il y a :

1.2.1. Le lactosérum acide ou lactosérum Quark

Il est obtenu après coagulation du lait par précipitation des caséines à leur pH isoélectrique de 4,6. L'acidification peut être obtenue par ajout d'acide (acide chlorhydrique, sulfurique ou lactique) ou par passage sur résines échangeuses d'ions (cas du fromage à pâte molle et à pâte fraîche). Son pH varie entre 4 et 5, avec une acidité supérieure à 1,8 g.L⁻¹.

1.2.2. Le lactosérum doux ou lactosérum présure

Il provient de la coagulation du lait par déstabilisation des micelles de caséine sous l'action de la présure (cas du fromage à pâte pressée cuite ou non cuite). Il aura un pH voisin de 6,2 avec une acidité inférieure à 1,8 g.L⁻¹. [4]

1.3. Composition chimique

Le lactosérum est composé de 90 % d'eau, principalement d'hydrates de carbone, de protéines, des minéraux et des vitamines B et C, vitamine B2 et lactoflavine qui sont responsables de la couleur jaune vert du lactosérum.

Il est primordial de connaître que la composition dépend surtout du lait d'origine et du procédé de coagulation des caséines. <2>

Toutefois, pour le lactosérum du fromage doux, il contient encore des résidus de présure active et un grand nombre de bactéries provenant principalement de la croissance du ferment lactique lors de la fabrication du fromage.

En un mot, le lactosérum est un milieu dilué complexe contenant essentiellement du lactose, des protéines globulaires, une fraction azotée non protéique, de la matière grasse et des minéraux. Sa composition moyenne est donnée au tableau 1.

Tableau 1 : Composition chimique moyenne du lactosérum

Compositions	Concentration par litre de lactosérum
Matières sèches	61 g
Lactose	48 – 42 g
Protéines	8 g
Graisses	2 g
Minéraux	5 – 7 g
Acide lactique	1 – 5 g
Calcium	0,5 – 1 g
Phosphore	0,5 g
Potassium	1,4 g
Sodium	0,45 g
Chlore	1,0 g
Magnésium	0,04 – 0,08 g
Zinc	0,3 – 2,3 mg
Fer	0,9 mg
Cuivre	0,2 mg
Manganèse	6 – 26 µg
Thiamine	0,4 mg
Riboflavine	1,4 mg
Pyridoxine	0,5 mg
Cobalamine	1,5 µg
Acide nicotinique	2 mg
Acide folique	50 µg
Acide ascorbique	9 mg
pH	6,0 – 4.5

Source : [4]

N.B : lorsque deux chiffres sont donnés, le chiffre de gauche correspond au lactosérum doux et celui de droite au lactosérum acide

1.3.1. Caractéristiques des protéines du lactosérum

Les protéines sont des éléments constitutifs essentiels de tout être vivant. Le lactosérum en contient des résidus qui n'ont pas précipité, ni à l'acide ni par l'action de la présure. Elles comprennent surtout les lactalbumines et les lactoglobulines. Elles demeurent en solution dans le « sérum isoélectrique » obtenu à pH = 4,6 à 20°C ou dans le sérum présure exsudé par le coagulum formé lors de l'emprésurage.

Quant à ses particularités, elles sont plus sensibles à la chaleur car dénaturées par chauffage et forment des flocons, elles deviennent alors insolubles sauf les protéoses-peptones. [4]

Toutes ces protéines peuvent être classées en 3 groupes hétérogènes selon le tableau 2 suivant.

Tableau 2 : Les trois groupes principaux de protéine du lactosérum

Groupe		Pourcentage %
GLOBULINES		13
PROTEOSES - PEPTONES		18,9
ALBUMINES	α -lactalbumine	19,7
	β -lactoglobuline	43,7
	sérumalbumine	4,7

Source : [4].

1.3.2. Caractéristiques du glucide du lactosérum

Le lactosérum est caractérisé par un ose appelé : «**lactose**». C'est un diholoside, composé d'une molécule de β -D-galactose et d'une molécule de D-glucose reliées entre elles par une liaison osidique β (1 $\rightarrow$ 4). Le nom officiel (IUPAC) du lactose est le β -D-galactopyrannosyl (1 $\rightarrow$ 4) D-glucopyrannose. Il peut être symbolisé par *Gal* β (1 $\rightarrow$ 4) *Glc* dont voici la figure. <3>

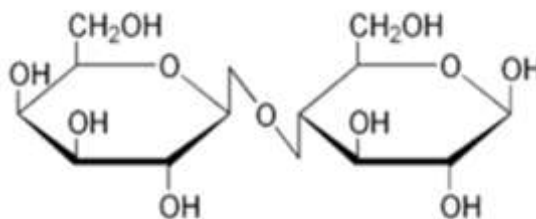


Figure 1 : Structure moléculaire du lactose <3>

❖ Propriétés chimiques du lactose

Le lactose est un solide blanc de formule brute $C_{12}H_{22}O_{11}$ et de masse molaire 342g.mol^{-1} . C'est un sucre réducteur, du fait de la présence d'une fonction hémi-acétylique dans sa formule.

Le lactose est dextrogyre car il fait tourner le plan de polarisation de la lumière vers la droite, cela est dû à la présence de carbones chiraux dans sa formule. Sa température de fusion est 223°C . Sa solubilité dans l'eau à 25°C est de 18 g pour 100 g de solution.

Le lactose a un pouvoir sucrant assez faible de 0,16, sa saveur sucrée étant de 16 % de celle du saccharose qui a un pouvoir sucrant de 1. <3>

1.3.3. Caractéristiques des lipides du lactosérum

Normalement, la teneur en lipides du lactosérum dépend principalement de la teneur en matière grasse du lait fromage. En effet, les lipides du lactosérum sont constitués d'environ deux tiers de lipide neutre et d'un tiers de lipide polaire, qui sont essentiellement des phospholipides tirant leur originalité de la présence d'une proportion importante de sphingomyéline et de leur faible proportion en acide gras polyinsaturé. <4>

1.3.4. Caractéristiques des germes du lactosérum

Outre les substances nutritives tels que : glucides, protéines, acides organiques, sels et peu de matières grasses, le lactosérum contient aussi des facteurs de croissance indispensables pour les microorganismes tels que les vitamines du groupe B. C'est donc un assez bon milieu de culture pour de nombreux germes, qui appartiennent pour la plupart au groupe des bactéries, mais aussi à ceux des levures et moisissures. Un grand nombre de bactéries provient principalement de la croissance du ferment lactique lors de fabrication du fromage.

Toutefois, on distingue trois grandes classes de germes dans le lactosérum :

❖ Les germes produisant des fermentations «favorables»

Elles conduisent à la production d'acide lactique à partir du lactose. Elles sont produites par les bactéries lactiques homofermentaires utilisées comme levain en technologie laitière. En abaissant le pH, elles inhibent le développement de certains germes pathogènes.

❖ Les germes produisant des fermentations « indésirables »

Elles produisent d'autres composés que l'acide lactique comme l'acide acétique, l'alcool et surtout du gaz carbonique en abondance, entraînant une perte de la valeur nutritive du lactosérum. Ce sont des germes hétérofermentaires que l'on trouve aussi bien parmi les bactéries que parmi les levures et moisissures. Souvent, ces composés formés sont responsables de mauvaises odeurs.

❖ Les germes pathogènes :

Les plus dangereux sont des bactéries et des virus qui peuvent se développer dans le lactosérum. La contamination du lactosérum par des agents pathogènes peut être le fait de la contamination initiale du lait à la sortie du pis de la vache, soit de la contamination ultérieure du lait et/ou du lactosérum par des bactéries du milieu environnant.

Le Tableau 3 présente les principaux agents pathogènes susceptibles d'être rencontrés dans le lactosérum.

Tableau 3: Principaux agents pathogènes pouvant être présents dans le lactosérum

	Agents bactériens	Agents viraux
Contamination initiale du lait	<i>Brucella</i>	Virus aphteux
	<i>Mycobactérium tuberculosis</i>	<i>Maedi visna</i>
	<i>Coxiella burnetti</i>	Virus de la leucose
	<i>Staphylococcus aureus</i>	--
Contamination du lait à la sortie du pis	<i>Escherichia coli</i>	--
	<i>Listeria monocytogenes</i>	--
	<i>Salmonella</i>	--

(Source : <6>)

En un mot, la diversité et le nombre des agents susceptibles d'être rencontrés sont très dépendants de l'état de santé du troupeau d'une part, et de la qualité hygiénique de la traite d'autre part. [5]

1.4. Valorisation

Le petit-lait est un sous-produit très précieux de la fabrication du fromage. Il existe différentes possibilités de le valoriser.

1.4.1. Utilisation à l'état natif

A l'état natif, le lactosérum peut servir à :

- ❖ L'alimentation du bétail mais cela peut poser un certain nombre de problèmes spécifiques du fait d'une part d'un risque sanitaire lié à la contamination du lactosérum par des agents pathogènes.
- ❖ L'élaboration de préparations laitières très anciennes et pauvres en matières grasses : recuite, ricotta, brocciu, sérac, brunost, etc.
- ❖ La fabrication d'une boisson contenant 35% de lactosérum filtré, une alternative aux boissons alcoolisées.
- ❖ Remplacer une partie du lait dans la chocolaterie ou la biscuiterie industrielle [5] et <3>.

1.4.2. Utilisation des protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum présentent un intérêt nutritionnel par leurs hautes valeurs énergétiques et leurs compositions en acides aminés essentiels qui ne sont pas synthétisés par l'homme. Elles sont très riches notamment en lysine et tryptophane. De ce fait, elles sont utilisées pour enrichir certains produits tels que le chocolat, les aliments infantiles [1].

1.4.3. Utilisation du lactose

Quant au lactose, il peut être :

- ❖ utilisé en confiserie et comme excipient en pharmacie.
- ❖ utilisé pour préparer le lactulose, un isomère du lactose utilisé comme ingrédient pharmaceutique actif dans le traitement de la constipation.
- ❖ utilisé pour la conception de fumigène, mélangé avec du chlorate de potassium et du chlorure d'ammonium. Ce mélange crée une épaisse fumée blanche non toxique, utile dans la résolution de problème de ventilation.
- ❖ utilisé comme substrat pour diverses fermentations. <3>

1.4.4. Utilisation des lipides du lactosérum

Les lipides du lactosérum sont peu valorisés. Cependant, la présence d'une forte proportion de sphingomyéline dans les lipides de la peau suggère un débouché possible pour les phospholipides du lactosérum en cosmétique, par exemple, dans des crèmes raffermissantes ou anti-âge [4].

Pour mieux comprendre, la figure 2 à la page 9 récapitule les possibilités d'utilisation et de valorisation du lactosérum.

1.5. Aspect réglementaire

La norme environnementale portant sur la classification des eaux de surface à Madagascar régie par le décret n°464/2003, fixe les normes de rejet d'effluents aqueux. Le contenu du décret se base sur le contrôle des paramètres biologiques et physico-chimiques illustré par le tableau 4 suivant :

Tableau 4: Les normes de rejet d'effluents aqueux

Paramètres	Classe A	Classe B	Classe C	Hors classe
Oxygène dissous (mg/L)	$5 \leq OD$	$3 < OD < 5$	$2 < OD \leq 3$	$OD < 2$
DBO 5 (mg/L)	$DBO \leq 5$	$5 < DBO \leq 20$	$20 < DBO \leq 70$	$70 < DBO$
DCO (mg/L)	$DCO \leq 20$	$20 < DCO \leq 50$	$50 < DCO \leq 100$	$100 < DCO$
Présence de germes pathogènes	Non	Non	Non	Oui
Couleur (échelle Pt-Co)	$couleur < 20$	$20 \leq couleur \leq 30$	$30 < couleur$	-
Température (°C)	$\theta < 25$	$25 \leq \theta < 30$	$30 \leq \theta < 35$	$35 < \theta$
pH	$6,0 \leq pH \leq 8,5$	$5,5 < pH < 6,0$ ou $8,5 < pH < 9,5$	$pH \leq 5,5$ ou $9,5 \leq pH$	-
MES (mg/L)	$MES < 30$	$30 \leq MES < 60$	$60 \leq MES < 100$	$100 < MES$
Conductivité ($\mu S/cm$)	$\chi \leq 250$	$250 < \chi \leq 500$	$500 < \chi \leq 3000$	$3000 < \chi$

Source : [4]

Afin de préserver les ressources en eau, les rejets d'eaux usées doivent être incolores, inodores. Ils doivent aussi respecter certaines qualités qui sont détaillées en ANNEXE I.

En outre, la transformation du lait en fromage produit du lactosérum contenant encore environ 50 g/l de matière organique (DBO) facilement biodégradable. La décomposition des matières organiques biodégradables par les microorganismes entraîne une consommation d'oxygène à l'origine d'un bouleversement écologique. De ce fait, la valorisation et/ou le traitement du lactosérum est inévitable. [6]

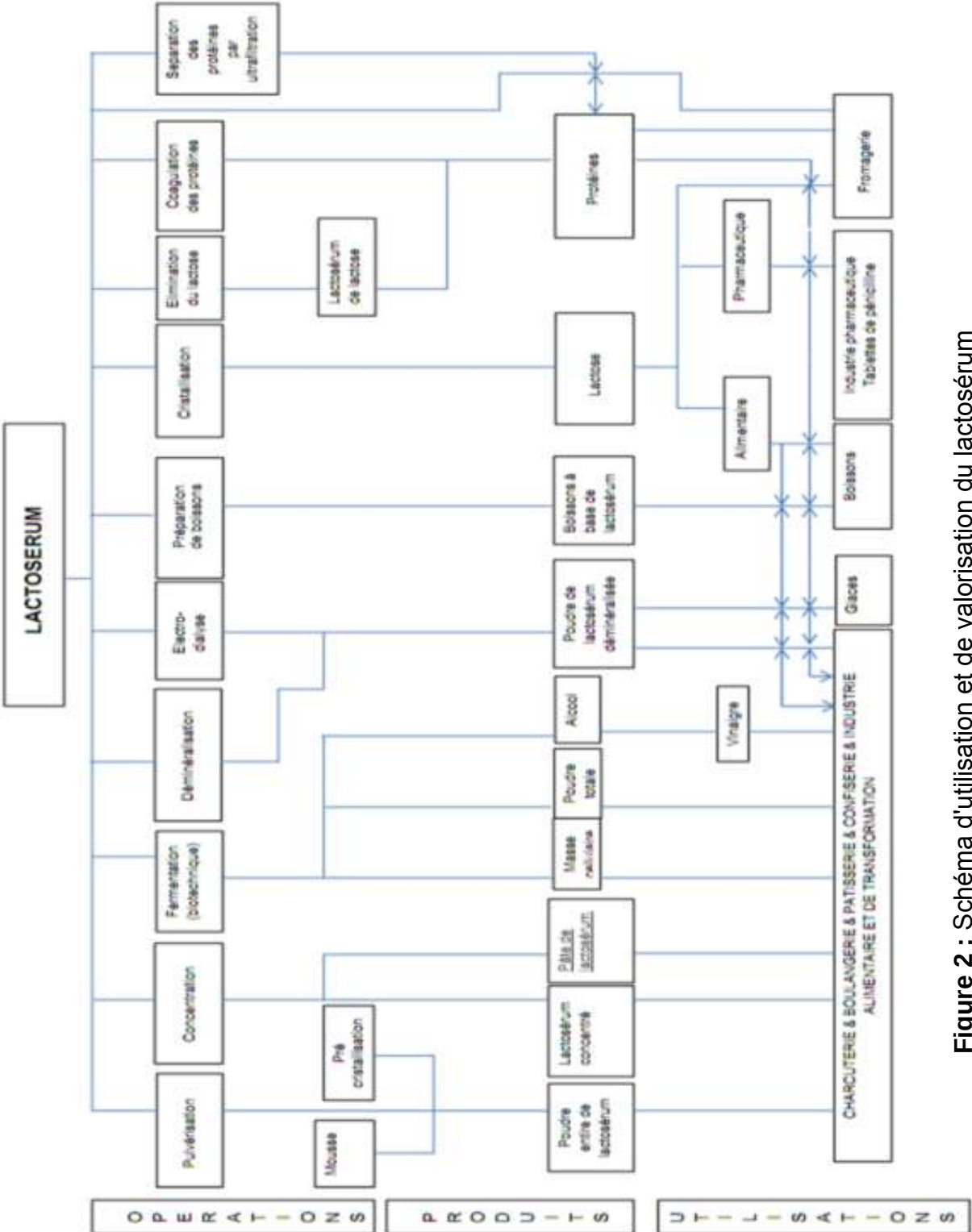


Figure 2 : Schéma d'utilisation et de valorisation du lactosérum [1]

CHAPITRE II : GENERALITES SUR L'ACIDE LACTIQUE

2.1. Historique

L'acide lactique fut découvert en 1780 par le chimiste suédois Carl Wilhelm Scheele qui l'isola sous forme impure du lait caillé. Plus tard, au début du XIX^{ème} siècle, un chimiste français du nom de Braconnot l'identifia dans l'eau de riz fermenté, le jus de chair à saucisse fermenté ainsi que dans les extraits de plantes fermentées, il l'appela "acide nancéïque". Enfin un chimiste allemand, Vogel démontra l'identité des acides de Scheele et de Braconnot.

2.2. Définition

L'acide lactique connu aussi sous le nom d'acide du lait, est un acide carboxylique, de formule chimique $C_3H_6O_3$. Sa structure se reflète dans son nom systématique, l'acide 2-hydroxy-propanoïque ($CH_3 - CHOH - COOH$).

Contrairement à ce que peut laisser penser son nom, l'acide lactique peut être aussi trouvé également dans le vin, certains fruits et légumes.

Le tableau 5 récapitule ses caractéristiques.

Tableau 5: Caractéristiques de l'acide lactique

Caractéristiques	Acide lactique
Apparence	liquide incolore à jaune visqueux ou cristaux incolores à jaunes. (DL).
Nom commun	acide lactique
Nom IUPAC	acide 2-hydroxypropanoïque
Source	lait,...
Structure	$CH_3-CHOH-COOH$
Type	Acides α hydroxylés

(Source : <6>)

2.3. Classification

Comme il possède un carbone asymétrique, il existe 2 énantiomères d'acide lactique. L'atome de carbone numéro deux portant le groupe hydroxyle est asymétrique rendant la molécule d'acide lactique chirale. Il se présente sous deux formes optiquement actives :

- ❖ le premier connu sous le nom L(+) acide lactique ou (S) acide lactique
- ❖ le second la forme D(-)acide lactique ou (R) acide lactique (image en miroir)

C'est la forme L(+) qui est la plus importante au niveau biologique.

La figure 3 montre les deux formes optiquement actives et la structure tridimensionnelle.

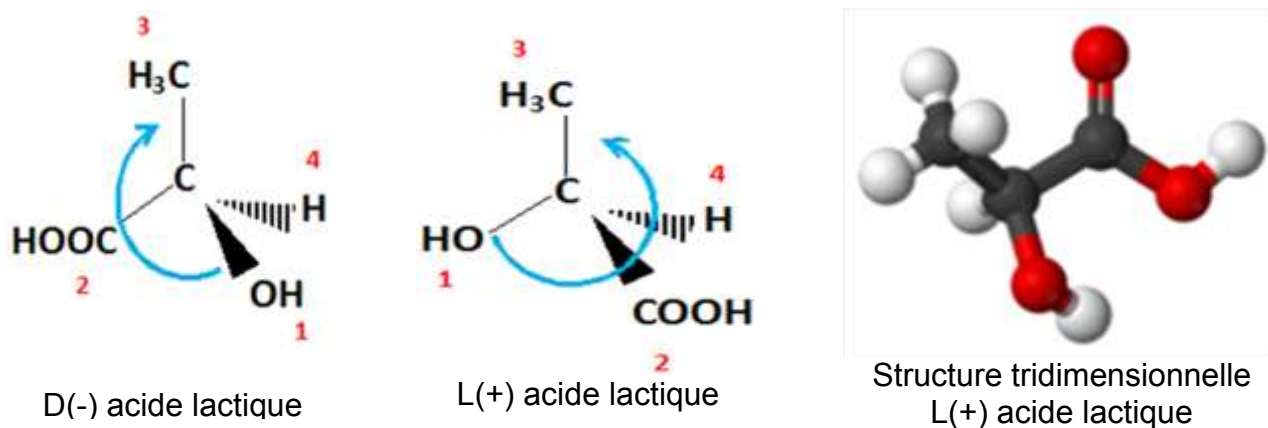


Figure 3 : Molécules (D/L) d'acide lactique & Structure tridimensionnelle <3>

2.3.1. Propriétés chimiques

Au point de vue chimique, l'acide lactique :

- ❖ se comporte comme un acide faible.
- ❖ s'écrit en formule brute $C_3H_6O_3$
- ❖ a une masse molaire de 90 g.mol^{-1} (C : 40 %, H : 6,71 %, O : 53,29 %)
- ❖ se présente sous forme liquide.
- ❖ pKa (20 °C) 3,86

2.3.2. Propriétés physiques <3>

L'acide lactique possède divers propriétés physiques :

- | | |
|------------------------|---|
| ❖ T° de fusion | D/L: 16,8 °C
L: 53 °C
D: 53 °C |
| ❖ T° d'ébullition | 122 °C |
| ❖ Solubilité | Miscible avec l'eau, l'alcool, le glycérol, et le furfural
Légèrement soluble dans l'éther;
Insoluble dans le chloroforme, l'éther de pétrole |
| ❖ Masse volumique | 1,2485 g.cm ⁻³ |
| ❖ Pouvoir rotatoire | [α] - 2,6 °
[α] + 2,6 ° |
| ❖ Indice de réfraction | r = 1,4414 |

2.4. Domaines d'utilisation [7] et [8]

L'acide lactique rencontre chaque jour de nouvelles applications, depuis l'utilisation classique en tant que conservant alimentaire jusqu'à de nouveaux développements. Ainsi, il présente des applications dans des domaines variés :

2.4.1. Alimentaire

- ❖ comme arôme, antimicrobien, source de calcium ou régulateur de pH dans les sauces, poissons, produits laitiers, viandes, fruits et légumes, boissons.
- ❖ utilisé comme additif (E270) en tant qu'antioxygène, acidifiant ou exhausteur de goût

2.4.2. Cosmétique <7>

- ❖ comme humectant, agent de rajeunissement de la peau, antimicrobien dans les crèmes de soin de la peau, les savons, les dentifrices.
- ❖ constitue une matière première pour la synthèse du para-hydroxybenzoate de propyle utilisé comme conservateur dans l'industrie cosmétique.

2.4.3. Pharmaceutique <6>

- ❖ comme matière première dans la synthèse des médicaments
- ❖ comme agent bactériostatique notamment sur des bactéries pathogènes comme la salmonelle (ou la listeria).

2.4.4. Industriel <3>

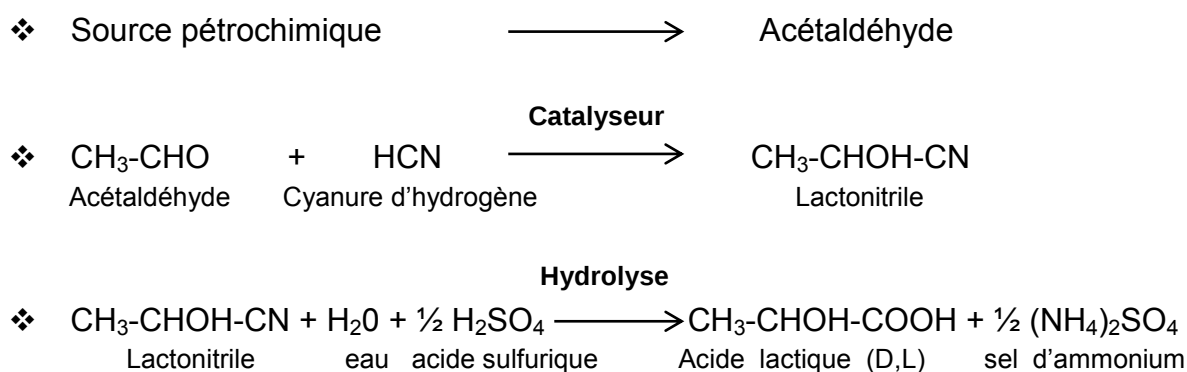
- ❖ comme agent complexant, solvant, détergent ou matière première dans les adhésifs, les peintures, les industries du papier et du textile et dans la synthèse d'insecticides.
- ❖ Il permet la synthèse d'un lactide dont la polymérisation conduit à un polymère biodégradable, appelé polylactide (PLA) ou bioplastique.

2.5. Différentes technologies de production d'acide lactique

L'acide lactique peut être synthétisé soit par voie chimique soit par voie microbienne.

2.5.1. Synthèse par voie chimique

L'acide lactique peut être synthétisé à partir du pétrole, du gaz naturel, du charbon et spécifiquement par hydratation du lactonitrile synthétisé à partir de la cyanure d'hydrogène et d'acétaldéhyde. Cette réaction s'effectue en phase liquide sous pression atmosphérique. Le lactonitrile brut, issu de cette réaction, est alors récupéré et purifié par distillation. Il sera ensuite dégradé en acide lactique à l'aide d'acide chlorhydrique ou d'acide sulfurique, produisant des quantités correspondantes de sels d'ammonium [9]. Les réactions correspondantes à la synthèse chimique de l'acide lactique sont :



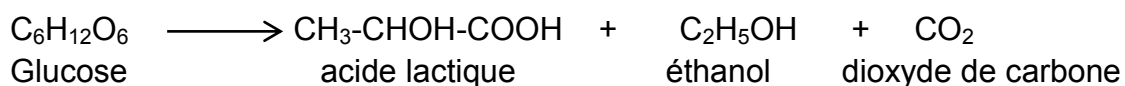
2.5.2. Synthèse par voie fermentaire

La synthèse se fait par fermentation des substrats carbonés purs (glucose, saccharose, lactose...) ou impurs (produits d'hydrolyse de l'amidon, mélasses...) à l'aide de microorganismes tels que certains champignons comme *Rhizopus oryzae* ou certaines bactéries des genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Lactococcus* [5] et <6>.

En effet, il existe deux types de fermentation :

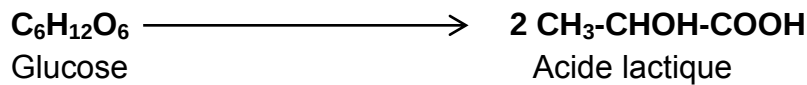
❖ Fermentation hétérofermentaire

Elle produit de l'acide lactique en même temps que d'autres composés tels que l'acétate et l'éthanol en général selon la réaction.

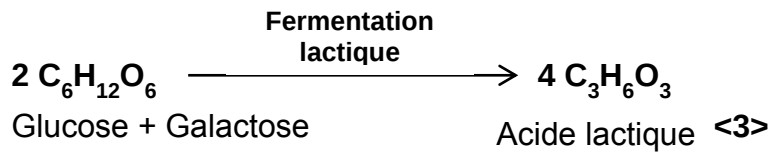
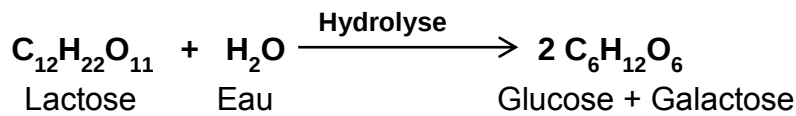


❖ Fermentation homofermentaire

Elle produit majoritairement de l'acide lactique selon les réactions :



A partir du lactose :



2.6. Production d'acide lactique

Environ 50% de la production mondiale de l'acide lactique provient des procédés de fermentation, la seconde moitié est assurée par des synthèses chimiques. Le marché mondial de l'acide lactique s'accroît d'année en année et le niveau de production atteint environ 0,35 Mt/an.

Certains observateurs ont pronostiqué l'accroissement mondial de la production aux alentours de 12 à 15% par an. [10]

CHAPITRE III : GENERALITES SUR LES BACTERIES LACTIQUES

3.1. Aperçu sur la taxonomie

Les bactéries lactiques font partie d'un grand groupe bactérien divisé en différents sous-groupes selon le genre et l'espèce qui peut être encore classée en sous espèces, variétés et souches (ex : *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis*. [11])

L'application de l'hybridation des acides nucléiques et des techniques de séquençage sur les bactéries lactiques conduit à diviser les coques en cinq groupes : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc*. [12]

Le tableau 6 présente les principaux critères de différenciation entre les genres des bactéries lactiques :

Tableau 6 : Principales bactéries lactiques

Genre	Morphologie	Fermentation	Température d'optimisation
<i>Lactobacillus</i>	bacille	homofermentaire ou hétérofermentaire	thermophile ou mésophile
<i>Bifidobacterium</i>	forme irrégulière	acétique et lactique	mésophile
<i>Carobacterium</i>	coque	hétérofermentaire	psychotrophe
<i>Lactococcus</i>	coque	homofermentaire	mésophile
<i>Streptococcus</i>	coque	homofermentaire	thermophile
<i>Enterococcus</i>	coque	homofermentaire	mésophile
<i>Vagococcus</i>	coque mobile	homofermentaire	mésophile
<i>Pediococcus</i>	coque en tétrade	homofermentaire	mésophile
<i>Tetragenococcus</i>	coque en tétrade	homofermentaire	mésophile
<i>Leuconostoc</i>	coque	hétérofermentaire	mésophile
<i>Oenococcus</i>	coque	hétérofermentaire	mésophile

Source : [12]

3.2. Définition

Les bactéries lactiques sont des êtres unicellulaires regroupant des bacilles et des coques à gram positif, non sporulés, à catalase négative, dépourvus de cytochrome, anaérobies mais parfois aérotolérants, à métabolisme fermentatif <4>

Certaines sont dites homofermentaires car elles produisent majoritairement de l'acide lactique alors que d'autres sont dites hétérofermentaires car elles produisent de l'acide lactique en même temps que d'autres composés tels que l'acétate, le dioxyde de carbone et l'éthanol.

3.3. Particularités

Elles ont toutes en commun la capacité de produire de l'acide lactique et elles présentent une innocuité et peuvent produire des substances qui s'avèrent avoir une activité antagoniste impressionnante vis-à-vis d'autres espèces bactériennes. [13]

3.4. Milieu de culture

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du microorganisme dont :

- ❖ la couverture des besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, l'apport de carbone et d'énergie ;
- ❖ un pH voisin du pH optimal avec une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).

Cependant, Il existe une grande variété de milieu de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des microorganismes. On distingue généralement :

3.4.1. Les milieux non sélectifs

Ils regroupent tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple et généralement peu coûteux. Ces milieux contiennent une base nutritive constituée de molécules azotées (acides aminés, facteurs de croissance diverses...).

3.4.2. Les milieux non sélectifs enrichis

Ils sont obtenus en incorporant au milieu de base adéquat un liquide ou des suspensions riches en molécules organiques diverses comme des suppléments polyvitaminiques.

3.4.3. Les milieux sélectifs

Les milieux sélectifs empêchent le développement de certains micro-organismes. Ils permettent une identification plus simple des germes qui sont utilisés pour l'isolement bactérien dans des produits polymicrobiens. La sélection peut être chimique ou par des antibiotiques. <9>

3.5. Utilisations des bactéries lactiques

Nous citons ici, les utilisations les plus courantes :

- ❖ Les bactéries lactiques sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés comme les produits laitiers (yaourt et fromage). Ces bactéries interviennent également dans la fabrication des salaisons, du vin et dans le saumurage des légumes. Elles contribuent à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques.
- ❖ Les bactéries lactiques améliorent la conservation par l'abaissement du pH inhibant la croissance de la plupart des germes non-lactiques. <10>
- ❖ Les bactéries lactiques peuvent aussi produire de nombreux agents antibactériens tels que les bactériocines (peptides ou protéines ayant une activité antibactérienne) qui inhibent la croissance des flores indésirables. [14]
- ❖ Les bactéries lactiques pourraient aussi servir de véhicules pour de nouveaux types de vaccins oraux. Les bactéries lactiques sont, en effet, susceptibles de délivrer des antigènes à la surface des muqueuses de telle sorte qu'une réponse immunitaire à la fois locale et générale se produise. <11>

3.6. *Lactococcus lactis*

3.6.1. Caractéristiques

Lactococcus lactis est une bactérie à Gram positif, non mobile, non sporulante, non pathogène mesurant en moyenne de 0,5 à 1,5 µm. Les cellules de ce microorganisme se regroupent habituellement par paire ou en courtes chaînes. Contrairement à de nombreux genre de *Streptococcus*, ces organismes ne se développent pas en longues chaînes. <12>

C'est une bactérie homofermentaire à métabolisme hétérotrophe, anaérobie-facultatif qui peut synthétiser des substances antibactériennes. Sa température optimale de croissance est de 30 °C.

Elles sont communément isolées des produits végétaux, céréales, haricots, pois, pomme de terre... [10]

3.6.2. Classification

Lactococcus lactis appartient à :

Règne : Bacteria
Embranchement : Firmicutes
Classe : Bacilli
Ordre : Lactobacillales
Famille : Streptococcaceae
Genre : *Lactococcus*

Lactococcus lactis se divise en trois sous-espèces :

- ❖ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- ❖ *Lactococcus lactis* subsp. biovar. *diacetylactis*
- ❖ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Le genre *Lactococcus* est relativement récent, et incorpore des espèces auparavant classées dans les genres *Streptococcus* tel que :

- ❖ *Streptococcus lactis* maintenant nommé : *L. l. subsp lactis*
- ❖ *Streptococcus cremoris* maintenant nommé : *L. l. subsp cremoris*
- ❖ *Streptococcus diacetylactis* maintenant nommé : *L. l. subsp biovar. d.*

[15] et <3>

3.6.3. Transport du lactose chez *Lactococcus lactis*

Les Lactococci sont capables de métaboliser le lactose, principal sucre du lait. Son entrée dans la cellule s'effectue par un système PTS spécifique : le PTS-lactose ou par une perméase.

- ❖ Système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS)

Il s'agit d'un groupe de translocation qui catalyse de façon concomitante l'entrée du sucre dans la cellule ainsi que sa phosphorylation. Ceci est très important car la proportion de consommation du sucre est proportionnelle à la formation du produit.

Et cette consommation ralentit avec l'effet physiologique comme l'augmentation du pH dans le milieu, existence de stress métabolique. Ainsi, le rendement de la conversion diminue.

Différentes protéines sont impliquées dans ce système dont les deux protéines de couplage énergétique l'enzyme I (EI) et HPr. Elles sont communes à tous les systèmes, alors que les complexes « enzyme II » (EII^S) sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport (Voir figure 4).

Lorsque le lactose est transporté par le système PTS^{lac} , il est phosphorylé en lactose-6-phosphate.

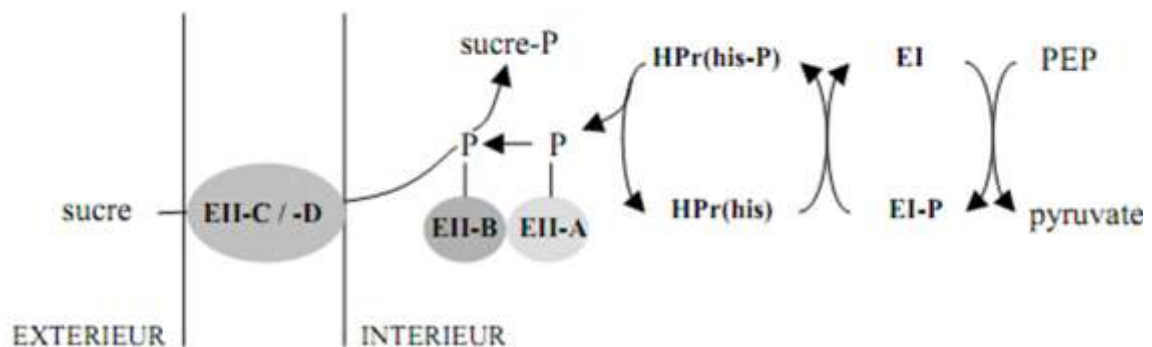


Figure 4: Système PTS [16] et [17]

❖ Système perméase énergie-dépendant

D'après ce concept, une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons générant ainsi un potentiel électrochimique de protons, appelé « *force protomotrice* », à travers la membrane. Dans ce cas, le transport du sucre est couplé au mouvement de protons le long du gradient électrochimique, il s'agit donc d'un transport actif puisqu'il peut s'effectuer contre le gradient de concentration du sucre.

Une fois à l'intérieur de la cellule, le substrat carboné est phosphorylé grâce à une kinase ATP-dépendante puis va être dégradé. Le mécanisme est illustré par la figure 5.

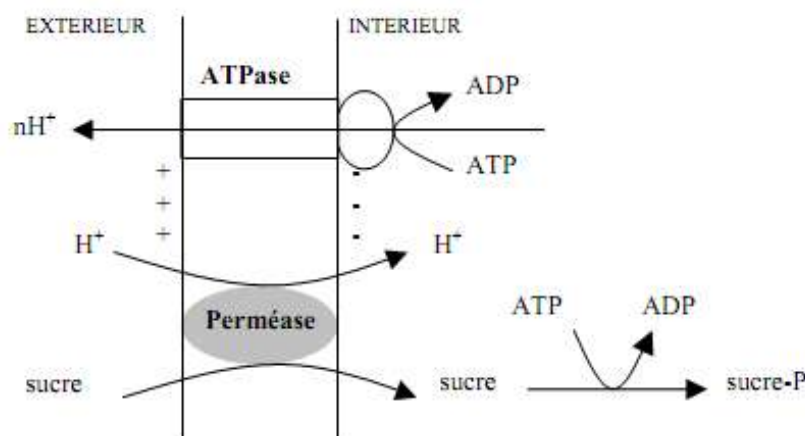


Figure 5: Système perméase [17]

3.6.4. Métabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis*

Le lactose est clivé par la β - galactosidase en glucose et galactose. Ces deux sucres subissent à la suite une dégradation selon la voie principale des hexoses phosphates (voie d'Embden-Meyerhoff Parnas, EMP) et secondairement selon la voie des pentoses phosphates.

La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA), est une enzyme clé présente chez toutes les espèces homofermentaires et indispensable au fonctionnement de la voie EMP. Cette enzyme catalyse la réaction menant à partir du fructose-1,6-bisphosphate (FBP) à deux molécules à 3 carbones, le dihydroxyacétone-phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (GAP). Quant au galactose-6-phosphate, il suit la voie du Tagatose qui elle-même rejoint la glycolyse au niveau des trioses-phosphate.

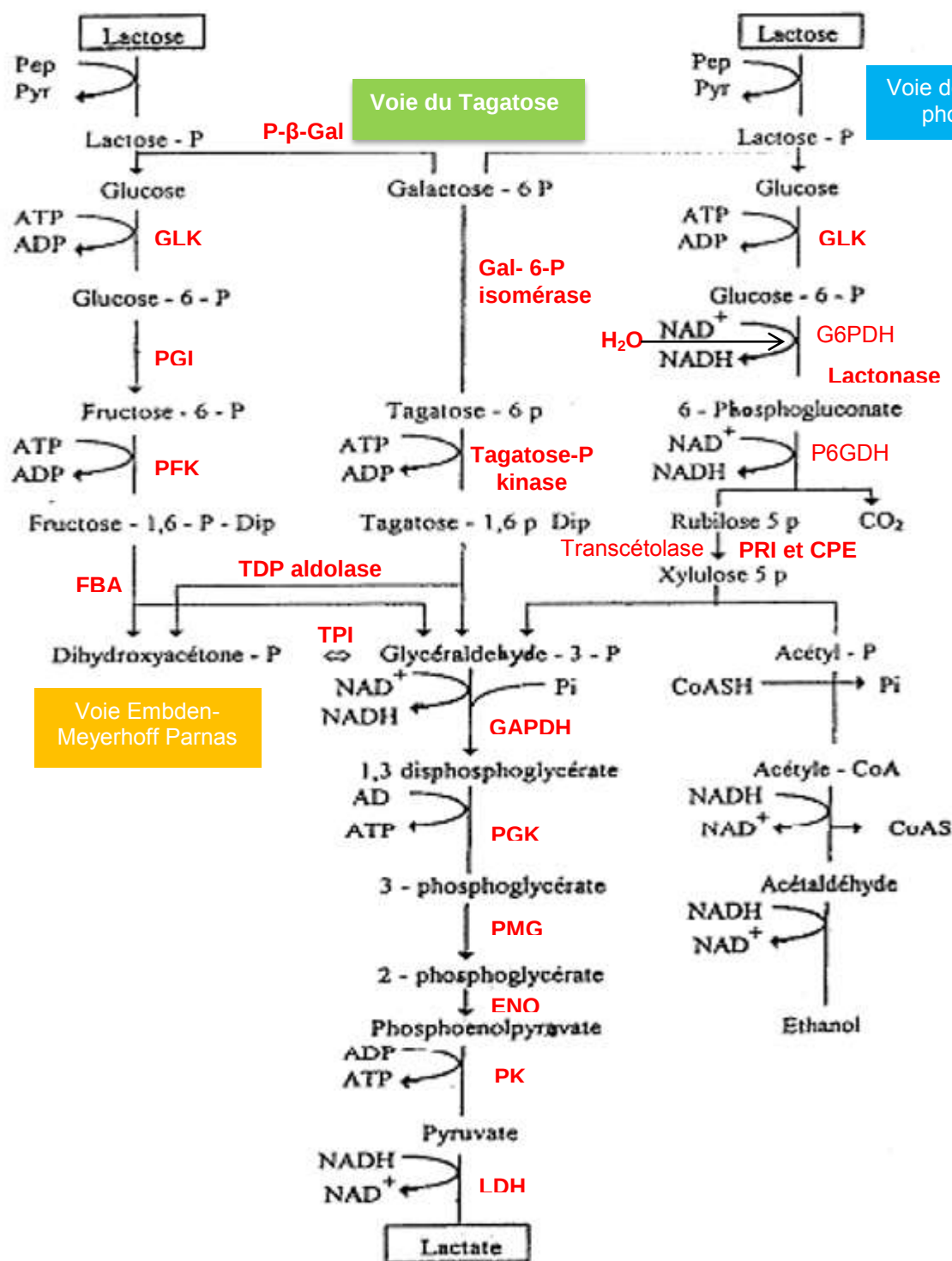
Pour la voie des pentoses phosphates, elle débute par une étape oxydative suivi d'une seconde étape non oxydative.

Toutes ces voies conduisent dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. [18]

Dans certaines conditions de croissance (certains sucres, limitation en carbone), le métabolisme de ces bactéries se diversifie vers un métabolisme mixte avec production en plus du lactate, de formiate, de CO_2 , d'acétate et d'éthanol (figure 6). [19]

VOIE HOMOFERMENTAIRE

VOIE HETEROFERMENTAIRE

Figure 6 : Métabolisme du lactose chez *Lactococcus lactis* [17].

GLK : Glucokinase, PGI : glucose-6-phosphate isomérase, PFK : phosphofructokinase, P-β-Gal : phospho-β-galactosidase, TPI : triose-phosphate isomérase, TDP aldolase : Tagatose-1,6-disphosphate aldolase, GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, PGK : phosphoglycérate kinase, PMG : phosphoglycérate mutase, ENO : énalase, FBA : La fructose-1,6-bisphosphate aldolase, PK : pyruvate kinase, LDH : lactate deshydrogénase. G6PDH : glucose-6-phosphate deshydrogénase, P6GDH : 6 - phospho gluconate deshydrogénase, PRI : phospho ribose isomérase, CPE : céto pentose épimérase.

CHAPITRE IV : GENERALITES SUR LA FERMENTATION LACTIQUE

4.1. Définition

La fermentation est une réaction biochimique de conversion de l'énergie chimique contenue dans une source de carbone (souvent du glucose) en une autre forme d'énergie directement utilisable par la cellule en l'absence d'oxygène (milieu anaérobie). Les voies fermentaires se déroulent au sein du cytoplasme bactérien.

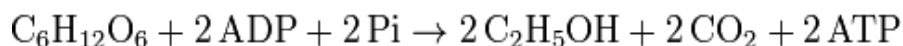
En effet, il s'agit d'une simple réaction d'oxydoréduction où l'accepteur final d'électron est souvent le produit final. Elle se caractérise par une oxydation partielle du produit fermentescible, et donne lieu à une faible production d'énergie car la différence de potentiel redox entre le donneur et l'accepteur d'électron est assez faible. <3>

4.2. Différents types de fermentation

On distingue plusieurs types de réaction de fermentation par la nature des produits de la réaction :

4.2.1. Fermentation alcoolique

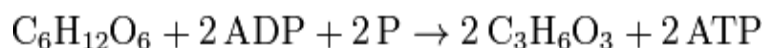
Dans le cas de la fermentation alcoolique, la réaction dégage de l'éthanol :



Le glucose, l'adénosine diphosphate (ADP) et le phosphate inorganique produisent de l'éthanol, du dioxyde de carbone et de l'adénosine triphosphate (ATP).

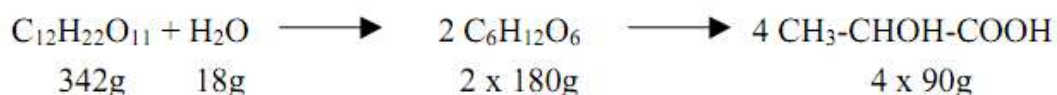
4.2.2. Fermentation lactique

La fermentation lactique produit de l'acide lactique.



Le glucose, l'adénosine diphosphate (ADP) et le phosphore produisent de l'acide lactique et de l'adénosine triphosphate (ATP). <3>

L'acide lactique peut être aussi obtenu de la dégradation du lactose par les bactéries. Quelques bactéries adaptées au métabolisme du lactose (possédant une β -galactosidase) réalisent cette fermentation qui donne comme métabolite final essentiellement de l'acide lactique.



Pourtant, la réaction est plus complexe qu'il n'y paraît, il s'agit d'une succession de 10 étapes dont les neuf premières sont communes à différentes fermentations. (Voir métabolisme du lactose page 21)

Il existe d'autres types de fermentation tels que la fermentation butyrique, acétique, etc.

4.3. Production d'acide lactique

4.3.1. Culture discontinue

C'est une culture en système closensemencé avec un milieu de préculture dans des conditions physico-chimiques favorables à la croissance du microorganisme. Il n'y a pas d'addition d'éléments nutritifs au milieu de culture pendant la croissance.

La culture se développe jusqu'à ce qu'il y ait carence d'un nutriment essentiel ou jusqu'à ce qu'une modification importante de l'environnement bloque la croissance (accumulation d'un produit toxique, consommation totale du substrat, changement du pH).

4.3.2. Paramètres influençant la croissance

Ces facteurs sont intimement liés aux caractéristiques de l'environnement et influencent le comportement des microorganismes dans un milieu de culture donné.

4.3.2.1. Température

C'est un facteur régulateur important de la croissance microbienne et de l'activité enzymatique. Elle accroît la vitesse de l'ensemble des réactions. Cependant, quand la température augmente, la vitesse de dénaturation des protéines bactériennes (enzymes en particulier) s'accroît. Or, quand toutes les molécules protéiques à activité métabolique sont dénaturées, le germe a une vitesse de croissance nulle. [20] Les variations de la vitesse de croissance en fonction de la température correspondent donc à la somme de deux phénomènes représentés par la figure 7.

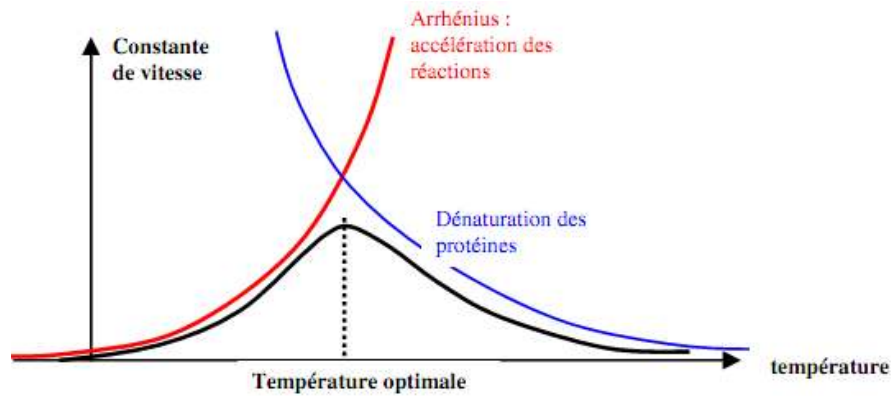


Figure 7 : Variation de la vitesse de croissance en fonction de la température <3>

Néanmoins, chaque type de réaction particulière nécessite une gamme de température optimale ce qui les fait classer en trois principales catégories :

- ❖ Thermophiles : capables de se multiplier au-dessus de 45°C
- ❖ Mésophiles : se développent entre 15 et 45°C
- ❖ Psychrophiles : ont une température de croissance au-dessous de 15 °C

4.3.2.2. pH <15>

Il affecte considérablement la croissance bactérienne. Chaque espèce se développe dans une gamme définie de pH et possède un pH optimum de croissance.

- ❖ acidophiles 1 < pH optimum < 5,5
- ❖ neutrophiles 5,5 < pH optimum < 8
- ❖ alcalophiles 8,5 < pH optimum < 11,5

Une forte variation de pH endommage les bactéries en détruisant leurs membranes plasmiques, en inhibant l'activité des enzymes et en détruisant les protéines membranaires de transport.

L'influence du pH sur le développement microbien est particulièrement déterminante. Parmi les micro-organismes, seules les bactéries lactiques, les levures et les moisissures peuvent se développer à pH inférieur à 5. L'activité des enzymes est aussi très sensible aux variations du pH dont voici la figure.

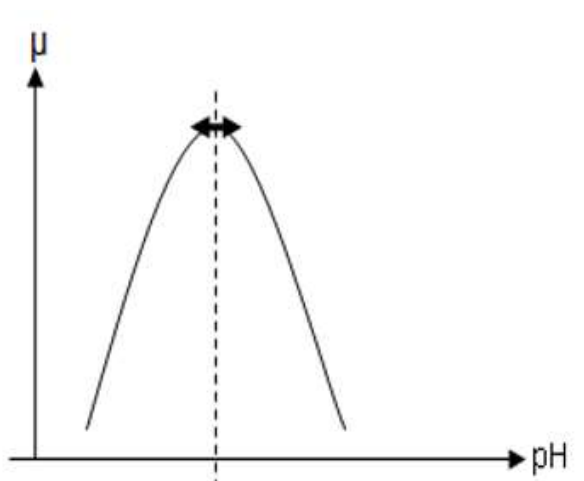


Figure 8 : influence du pH sur le développement microbien <15>

4.3.2.3. Concentration en substrat

La vitesse spécifique de croissance d'une espèce dépend étroitement du milieu dans lequel on la cultive. **AMRANE et al., 1999** ont montré que les vitesses et les rendements de fermentation s'améliorent lorsque le milieu de culture est complété avec des composés facilement assimilables. Cependant, le substrat peut devenir limitant à forte concentration. [21]

4.3.2.4. Concentration en inoculum

Les résultats d'**AMRANE et al., 1999** ont démontré que la phase de latence diminue quand la taille de l'inoculum augmente. [21]

4.3.2.5. Effet de l'agitation

L'agitation se définit comme l'opération qui crée ou accélère le contact entre deux ou plusieurs phases : gazeuse et liquide. C'est un facteur complémentaire pour le transfert d'oxygène mais également pour les autres éléments du milieu. [22]

L'agitation a donc pour but d'assurer :

- ❖ l'homogénéisation du milieu afin de minimiser les différences de concentration et de faciliter le transfert de chaleur.
- ❖ La mise en suspension des particules surtout lors de la formation de structures pluricellulaires (amas, chaînette, mycéliums et « pellets »)
- ❖ La distribution de l'oxygène par dispersion des bulles d'air dans le milieu en ralentissant la coalescence des bulles. <13>

4.3.2.6. Besoins en facteurs de croissance <3>

Un facteur de croissance est une substance ou un élément nécessaire à la croissance d'un micro-organisme et qui ne peut être synthétisé par celui-ci.

Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance comme : la vitamine B, acides aminés, peptides, que l'on devrait lui fournir.

4.3.2.7. Facteurs d'inhibition

Certains produits chimiques modifient la croissance des bactéries en la ralentissant. Ce sont des inhibiteurs spécifiques, essentiellement liés à la production d'acide lactique et qui causent la plus importante inhibition des activités métaboliques. [23]

4.3.3. Cinétique de croissance <13>

En général, l'étude de la croissance se fait en milieu optimal de croissance non renouvelé de la bactérie et dans des conditions physico-chimiques optimales.

Dans ce sens, la notion de croissance recouvre deux aspects :

- ❖ la croissance de la cellule bactérienne (taille, masse, volume)
- ❖ le phénomène de multiplication cellulaire (population)

Pour simplifier, on assimile souvent la croissance à la multiplication cellulaire conduisant à la synthèse de biomasse bactérienne.

Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en sous-produits du métabolisme, éventuellement toxiques.

La croissance s'étudie en milieu liquide. Il existe 6 phases dont l'ensemble constitue la courbe de croissance. Soit N le nombre de la population à l'instant t , soit N_0 la population initiale, μ la vitesse spécifique de croissance, G le temps de génération.

4.3.3.1. La phase de latence (1)

Il s'agit d'une période au cours de laquelle les cellules synthétisent les enzymes qui vont leur être nécessaires pour utiliser les substrats (éléments nutritifs) du milieu. Il n'y a pas de division cellulaire: $N=N_0$ et $\mu=0$. La durée de cette phase dépend de l'âge des bactéries et de la composition du milieu.

4.3.3.2. La phase d'accélération (2)

Les divisions cellulaires commencent: N augmente, la vitesse de croissance spécifique μ augmente et le temps de doublement des bactéries G diminue.

4.3.3.3. La phase exponentielle (3)

Le taux de croissance atteint sa valeur maximale ($\mu=\mu_{\max}$). Cette phase dure tant que la vitesse de croissance est constante. Le temps de doublement des bactéries est le plus court. La masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle).

La croissance exponentielle peut être décrite par les paramètres suivants :

❖ Loi fondamentale de la croissance

A partir d'une unique cellule, le cycle cellulaire donne naissance à deux cellules filles qui vont chacune donner à leur tour deux autres cellules et ainsi de suite, selon une progression géométrique : 1 cellule ---> 2 cellules ---> 4 cellules ---> 8 cellules ---> 16 cellules ---> 32 cellules ...

Soit N_0 la biomasse initiale. Selon le principe de scissiparité des bactéries, on peut donc écrire :

Après 1 division : $N_1 = 2 N_0$

2 divisions : $N_2 = 2 \times N_1 = 2 \times 2 \times N_0 = 2^2 N_0$

3 divisions : $N_3 = 2 \times N_2 = 2 \times 2 \times 2 \times N_0 = 2^3 N_0$

n divisions : $N_n = 2^n N_0$

N_n : nombre d'individus dans la population après n génération.

N_0 : nombre d'individus dans la population à t_0

n : est le nombre de générations.

❖ Le taux de croissance ou vitesse spécifique de la croissance μ :

On estime la vitesse de croissance μ en posant l'équation suivante :

$$\mu N = dN / dt \quad \text{or } N = N_0 \cdot e^{\mu t}$$

$$\text{Alors } \ln(N) = \ln(N_0) + \mu t$$

En outre, μ correspond à la pente de la phase exponentielle de croissance de la courbe $\ln N = f(t)$ d'où :

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

❖ Le temps de génération (G)

C'est le temps de doublement de la population.

$$G = t / n \quad \text{avec } t = \text{intervalle de temps } (t - t_0) \text{ et } n = \text{nombre de divisions}$$

On peut aussi calculer le temps de génération avec la formule suivante :

$$G = 1 / \mu \quad \text{avec } \mu \text{ la vitesse spécifique de croissance}$$

❖ Rendement de biomasse par rapport à la consommation du substrat (%)

Le rendement est un indice de l'efficacité de conversion des éléments nutritifs en matériel cellulaire. La masse microbienne produite à partir d'un nutriment s'exprime quantitativement comme le rendement de croissance, noté $Y_{X/S}$:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta D.O \times \text{unité d'absorption}}{\Delta S} \times 100$$

❖ Vitesse moyenne d'acidification V_{mac}

Dans un système discontinu, la vitesse moyenne d'acidification est la variation de la concentration de l'acide lactique au cours du temps de sa synthèse. Elle s'exprime en $g.L^{-1}.h^{-1}$. Ce paramètre est important car il caractérise la performance de la fermentation outre la croissance selon la formule :

$$V_{mac} = dP / dt$$

Avec **dP** : lactate synthétisé en g/L
dt : temps en heures

❖ Rendement de production de métabolites ou taux de conversion $Y_{P/S}$

Le rendement sert à estimer la capacité de conversion d'un substrat donné en produit. Il s'exprime en gramme de produit par gramme de substrat métabolisé selon la formule :

$$Y_{P/S} = S_0 - S_{32} / S_0$$

Avec S_0 : quantité en substrat à temps zéro (g)
 S_{32} : quantité en substrat (g) à temps égale à 32 heures

4.3.3.4. La phase de ralentissement (3)

Elle correspond au début de l'épuisement des nutriments du milieu et de l'accumulation des déchets: N augmente, μ diminue et G augmente.

4.3.3.5. La phase stationnaire(4)

La croissance apparaît nulle. Autant de cellules apparaissent qu'il n'en disparaît par lyse cellulaire. N est constant et maximal. On observe un ralentissement de la croissance aboutissant à une phase stationnaire caractérisée par une densité maximale de population microbienne (N_{max}).

4.3.3.6. La phase de déclin (5)

Le nombre de cellules qui meurent augmente. Les nutriments sont épuisés et les déchets s'accumulent. N diminue, μ est nul.

Les caractéristiques des différentes phases de croissance peuvent être graphiquement représentées par la courbe $\ln(N) = f(t)$. Lorsque les conditions de milieu sont favorables, la croissance microbienne suit l'allure de la figure 9.

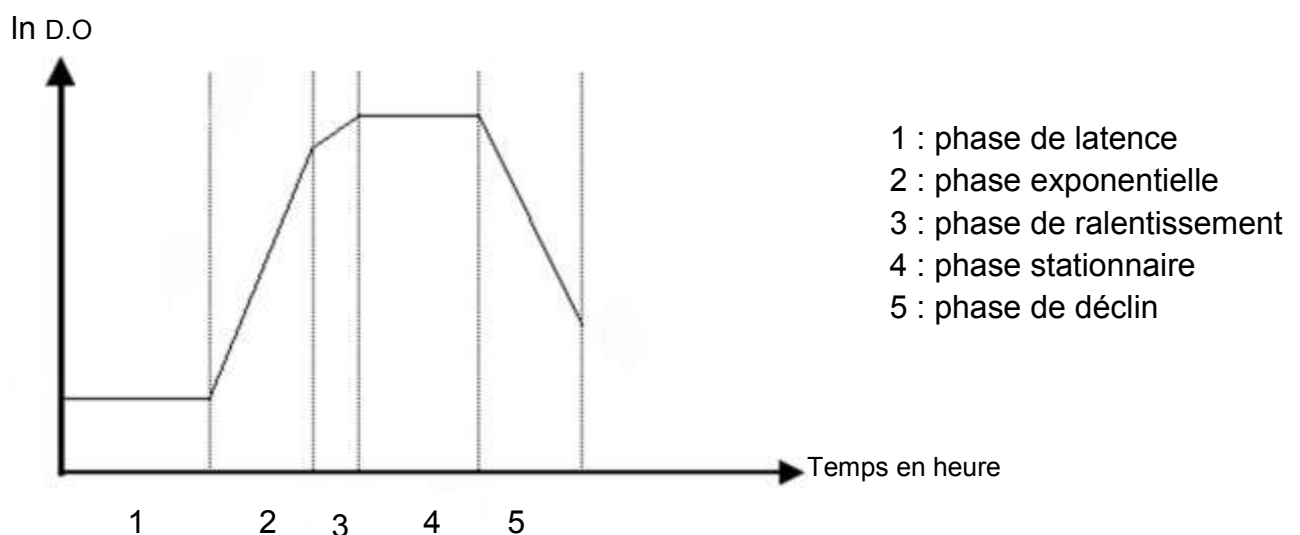


Figure 9 : Courbe de croissance

CONCLUSION PARTIELLE

En guise de conclusion, le lactosérum est un sous-produit de l'industrie laitière, composé principalement d'eau, d'hydrates de carbone, de protéines, de minéraux, de vitamines B et C, vitamine B2 et de lactoflavine. Il renferme environ 50 g/l de matière organique (DBO) facilement biodégradable entraînant une consommation d'oxygène à l'origine d'un bouleversement écologique. Or, cette matière organique présente plusieurs voies de valorisation dont la plus importante est la transformation du lactose en acide lactique. L'acide lactique étant un acide carboxylique de formule chimique $C_3H_6O_3$ dispose des applications dans des domaines variés. Il peut être synthétisé par voie chimique ou par voie biologique. A partir du lactose, la synthèse se fait par voie biologique par le biais des bactéries lactiques qui sont des êtres unicellulaires ayant la capacité de produire de l'acide lactique. Or comme tout être vivant, les facteurs environnants peuvent influencer la croissance de ces bactéries voire même la synthèse d'acide lactique. Cela nous mène à la deuxième partie du devoir consacrée à l'optimisation et à la production d'acide lactique.

PARTIE II :

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I : MATERIELS ET METHODES

Notre travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie et de Microbiologie Nanisana (LCM). Il a comme objectif de valoriser le lactosérum doux provenant de la « FROMAGERIE de BEVALALA » situé à quelques dizaines de kilomètres d'Antananarivo (**ANNEXE II**), en acide lactique, par le biais d'une bactérie lactique.

Il consiste dans un premier temps à optimiser les paramètres physico-chimiques de croissance tels que : la quantité du substrat ; l'agitation ; la température ; la quantité de l'inoculum, à pH non contrôlé y compris le traitement du lactosérum en milieu de culture, l'isolement de *Lactococcus lactis*. Dans un deuxième temps, la présente étude se propose de produire de l'acide lactique en étudiant les paramètres de croissance.

1.1. MATERIELS

1.1.1. Appareils et réactifs

Ils sont présentés en **ANNEXE III**.

1.1.2. Milieu de production

Le milieu de production utilisé est le « lactosérum limpide déprotéiné stérile ».

1.1.3. Milieu de culture pour les bactéries lactiques

Le milieu utilisé est le milieu MRS Difco, milieu adapté à la recherche spécifique des lactobacilles. Il est supplémenté en lactose à raison de 5 g/L dont sa composition est détaillée en **ANNEXE IV**.

1.1.4. Milieu de préculture EPT

Le milieu de préculture utilisé est l'EPT liquide à 2,55%. C'est un milieu non sélectif qui permet la multiplication de la plupart des germes. Il a pour rôle d'inoculer le milieu de culture « le lactosérum déprotéiné stérile ». Sa composition est donnée en **ANNEXE V**.

1.1.5. Matériel biologique

La souche utilisée lors de ce travail est *Lactococcus lactis*, contenue dans un ferment nommé CHOOZIT MA 400-1, sous forme lyophilisé. (**ANNEXE VI**).

1.2. METHODES

1.2.1. Prétraitement du lactosérum (ANNEXE VII)

Cette opération vise à transformer le lactosérum brut en milieu de culture par le biais de trois opérations : précipitation, filtration, décantation.

Le principe est basé sur la précipitation à chaud des protéines du lactosérum et des autres composés non thermostables à une température de 75°C. La précipitation est arrêtée quand la solution apparaît limpide (5 à 10 minutes). Puis, on procède à la filtration de la solution hétérogène. Ainsi, la majorité du précipitât est éliminée.

Cependant, certains précipitâts peuvent y passer. En cas de nécessité, on laisse la solution se décanter et on élimine le décantât par la suite.

Ces deux dernières opérations sont à répéter jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Le filtrat limpide recueilli est ajusté à pH = 7 avec une solution de soude normale.

N.B Après l'autoclavage, on observe une petite quantité de protéine précipitée qui échappe au prétraitement.

1.2.2. Stérilisation

La stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux de culture destinés aux manipulations. Pour cela, plusieurs méthodes physiques ou chimiques sont adoptées :

Le flambage : Il est basé sur l'emploi du bec Bunsen réglé avec une flamme bleue. Cette méthode est utilisée pour la stérilisation du matériel de manipulation : extrémité de l'œse, col des tubes à essais, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers...

Stérilisation à la chaleur sèche à une température de 180°C pendant 90 minutes pour les verreries.

Autoclavage : Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés. Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 121°C, pendant 15 minutes.

1.2.3. Bactéries lactiques

Lactococcus lactis dans notre cas est présente dans un mélange d'autres souches lactiques, nommé CHOOZIT MA 4001, sous forme lyophilisé. De ce fait, l'isolement de la souche du mélange constitue la première opération à faire. Et ce dernier fait appel à diverses techniques telles que l'activation.

1.2.3.1. Activation des bactéries lactiques

L'objectif est de faire passer les bactéries de l'état latent à son état normal. La première étape donc consiste à les activer. Dans notre cas, on jouera sur les paramètres physico-chimiques d'incubation afin de déclencher le passage de l'état latent à l'état activé. Puis, on procède à l'ensemencement des bactéries dans du milieu de culture MRS Lactose.

L'activation est réussie, dès l'apparition de colonies dans le milieu de culture MRS Lactose.

1.2.3.2. Isolement – Identification de *Lactococcus lactis*

Les bactéries lactiques regroupent un ensemble d'espèces hétérogènes dont le trait commun est la production d'acide lactique. Dans notre cas, on vise à étudier une souche lactique appelé *Lactococcus lactis*.

a. Isolement par épuisement

Il est réalisé sur milieu MRS Lactose agar, à pH acide 6,5. Ce milieu sélectif facilite la différenciation des bactéries par leur caractère acide. Il inhibe également le développement des germes non acidophiles. Ainsi, seules les bactéries lactiques ont la capacité de se développer sur le milieu MRS Lactose agar.

A partir du mélange d'espèces bactériennes activées dans le CHOOZIT MA 400-1, on va piquer plusieurs fois une colonie plus ou moins isolée de chaque type et l'ensemencer respectivement dans du milieu MRS Lactose agar de telle façon à avoir une culture homogène. Généralement, on fait au moins quatre repiquages pour que la souche étudiée soit pure, propre et bien isolée.

L'isolement est terminé quand on arrive à avoir une culture homogène constitué par un même type de colonie.

b. Identification

Le principe est basé sur l'étude des caractères morphologiques et biologiques des bactéries à partir d'une souche pure. Or l'étude de ces caractères requiert deux types d'observation.

❖ Observation macroscopique

L'observation macroscopique ou observation à l'œil nu nous aide à relever des caractères de la colonie tels que :

✚ Allure de contours	(Lisse, dentelée, irrégulière ou déchiquetée)
✚ Aspect de la surface	(Lisse, rugueuse, muqueuse)
✚ Coloration	(Grisâtre, blanchâtre, ocre)
✚ Consistance	(Grasse, crémeuse, sèche)
✚ Forme du relief	(Bombée, semi-bombée, plate)
✚ Taille	(Grande, moyenne, petite)
✚ Transparence	(Opaque, translucide ou transparente)

❖ Observation microscopique

L'observation microscopique permet de relever les caractères morphologiques des bactéries. Il fait appel à l'utilisation d'un microscope. Il faut généralement faire subir un traitement pour rendre les bactéries observables, parce qu'elles sont très transparentes dans leurs états naturels (vivantes). Cela nous amène à la coloration Gram.

❖ Coloration GRAM (ANNEXE VIII)

La coloration GRAM a comme objectif d'identifier les espèces bactériennes d'après leur affinité pour les colorants. Elle permet de classer les espèces bactériennes à partir d'une simple observation microscopique en deux grands groupes : Gram + et Gram -.

Le principe est basé sur la technique de coloration double. Les cellules Gram + et Gram - absorbent toutes les deux, le colorant primaire (Violet de gentiane) dans leur cytoplasme. L'iode du réactif de lugol forme un précipité avec ce colorant et le fixe donc à l'intérieur des cellules. L'alcool utilisé ensuite traverse facilement la membrane cellulaire des cellules Gram -, dissout le complexe colorant-iodine, l'élimine et laisse donc la cellule incolore.

Dans les cellules Gram +, qui ont une structure membranaire différente, l'alcool pénètre difficilement, la dissolution du complexe est lente et son élimination plus lente encore. La plus grande partie du complexe colorant iode reste donc dans la cellule, qui garde sa coloration violette.

Le colorant rouge (la Fuschine) utilisé pour terminer ne sert qu'à recolorer dans ce ton plus clair les cellules Gram –.

Ainsi, les bactéries réagissent de deux façons différentes et forment deux groupes bien distincts :

- ✚ Gram + qui résistent à la décoloration, retiennent les colorants et apparaissent en violet.
- ✚ Gram - qui ne résistent pas à la décoloration, ne retiennent pas les colorants et perdent la coloration violette.

1.2.3.3. Conservation de la souche étudiée (ANNEXE IX)

La conservation se fait sur milieu MRS Lactose incliné à +4°C en tube à essai à l'obscurité. Elle est obtenue en faisant une strie serrée dans le tube vissé contenant du milieu MRS Lactose avec une souche pure de *Lactococcus lactis*. Il faut avoir soin évidemment de prendre les précautions d'asepsies habituelles (bouchage, flambage...). L'entretien des souches s'effectue par des repiquages successifs sur milieux MRS Lactose.

1.2.4. Optimisation des paramètres physico-chimiques

Lors de l'optimisation, on fait varier les paramètres physico-chimiques d'incubation pendant la culture. Il faut noter que l'ensemencement de *Lactococcus lactis* dans le lactosérum déprotéiné se fait par l'intermédiaire d'un milieu de préculture dont l'étape est décrite ci-dessous.

1.2.4.1. Milieu de préculture

L'EPT est inoculée à l'aide d'un inoculum de *Lactococcus lactis* de manière stérile. Puis, incubé à 37°C pendant 12 heures afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance.

1.2.4.2. Conduite de la culture

Il s'agit d'une culture discontinue du lactosérum déprotéiné stérile, inoculée à raison de 10% (v/v) à l'aide de la préculture dont les bactéries sont en phase exponentielle de croissance.

Dans ce cas, on répartit le lactosérum déprotéiné stérile dans des erlenmeyers de capacité 250 mL avec 100 mL de volume utile, soit 90 ml du substrat et 10 ml de préculture. Ainsi, la culture est suivie pendant une période de 32 heures où l'on fait des prélèvements toutes les deux heures. La figure 10 nous résume les étapes.

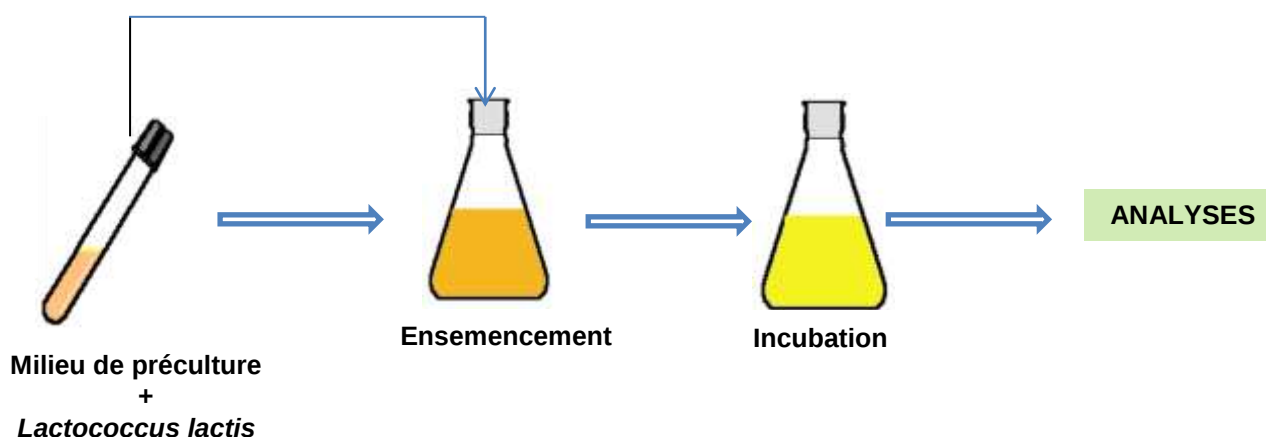


Figure 10 : Principe de la culture

1.2.5. Production d'acide lactique

Elle s'effectue avec les paramètres optimales de croissance tout en suivant les paramètres de croissance de *Lactococcus lactis* dans le lactosérum déprotéiné stérile.

1.2.6. Méthodes d'analyse

1.2.6.1. Biomasse

L'évaluation de la biomasse bactérienne se base sur l'évaluation du nombre de bactéries. Il existe alors une relation entre ce nombre et la biomasse. Diverses méthodes peuvent être utilisées :

a. Méthode par mesure de la densité optique

Elle s'effectue grâce à un spectrophotomètre par mesure de l'absorbance à 580 nm (Spectrophotomètre UV – 160 A).

Selon la loi de Beer Lambert, l'absorption de la lumière par une solution obéit à une loi exponentielle. Cela signifie que chaque molécule contenue dans la solution capte non pas la même quantité absolue de lumière mais la même proportion par rapport à la lumière incidente. Il en découle une relation exponentielle entre la quantité de substance absorbant la lumière et la quantité de lumière absorbée. La quantité de substance absorbante dépend de l'épaisseur de la solution traversée et de la concentration. Si on choisit une épaisseur constante (cuve de 1 cm d'épaisseur pour la plupart des spectrophotomètres), la quantité de lumière ne dépend plus que de la concentration.

La loi de Beer-Lambert exprime cette relation par la formule suivante :

$$I = I_0 \cdot 10^{-Klc}$$

Où I_0 = intensité de la lumière incidente ; I = lumière transmise ; l = épaisseur traversée (soit souvent 1 cm) ; K = une constante caractéristique de la substance et c = la concentration en substance.

On peut la transformer en $\log(I/I_0) = K' \cdot c$ où $\log(I/I_0)$ est appelée absorbance ou densité optique, qu'il suffit de mesurer pour en déduire la concentration c en connaissant K' .

Les spectrophotomètres permettent de mesurer directement la valeur d'absorbance en lumière incidente monochromatique. On admettra que les cellules en culture se comportent comme une solution vis à vis de la loi de Beer-Lambert. La figure 11 montre le schéma du principe.

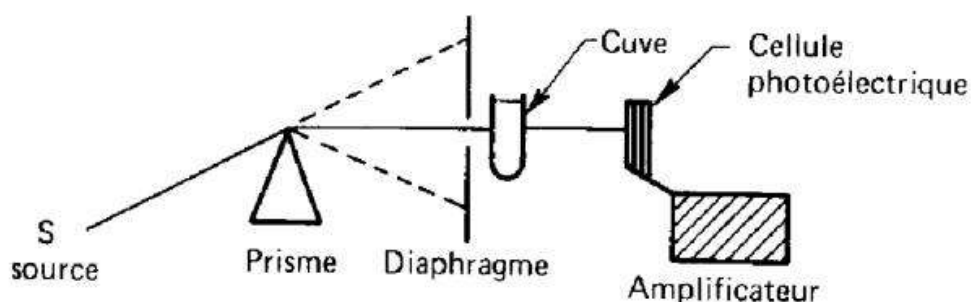


Figure 11 : Schéma de principe d'un spectrophotomètre

On réalise au préalable une gamme étalon au spectrophotomètre sur un prélèvement de solution de concentration en biomasse sec connue en g.L^{-1} .

Le tableau 7 montre la réalisation de la courbe étalon.

Tableau 7: Réalisation de la courbe étalon

N° Tube	0	1	2	3	4	5
Biomasse sèche g.L^{-1}	0	0,20	0,40	0,60	0,80	1,00

b. Méthode par comptage direct

Le principe est basé sur l'hypothèse selon laquelle chaque bactérie donne naissance à une colonie après incubation dans un milieu de culture favorable.

A partir de l'échantillon à analyser, plusieurs dilutions successives sont effectuées (dilution en cascade). Un volume de 0,1 mL de chaque dilution est ensuite déposé uniformément dans une boîte de Pétri contenant du milieu MRS Lactose puis incubé à l'étuve. Après incubation, les colonies présentes dans chaque boîte sont comptées avec un compteur de colonies Bioblock.

Seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies sont dénombrées, puis les résultats sont exprimés sous la forme d'unité formatrice de colonie par millilitre (UFC/mL) de l'échantillon à analyser. Le tableau 8 indique la réalisation de la dilution en cascade.

Tableau 8 : Réalisation de la dilution en cascade

N° tube	1	2	3	4	5	6
Volume du milieu (mL)	1	1	1	1	1	1
Volume d'EDS (mL)	9	9	9	9	9	9
Volume à ensemencé (mL)	1	1	1	1	1	1
Dilution finale (mL)	1/10	1/100	1/1 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000

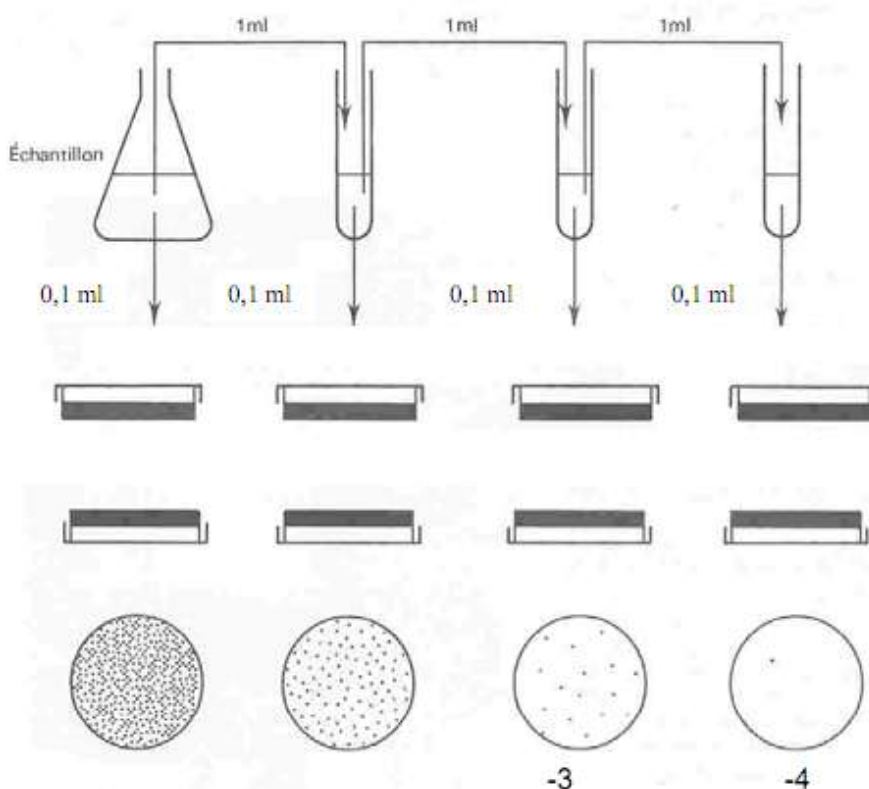


Figure 12 : Schéma du principe

Les résultats doivent être calculés à l'aide de l'équation générale :

$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Nombre de colonies dénombrées} \times \text{facteur de dilution}}{\text{Volume d'échantillon analysé (mL)}}$

1.2.6.2. Lactose : Méthode de FEHLING

Il s'agit d'utiliser la réaction des sucres réducteurs avec la liqueur de Fehling pour évaluer la concentration en sucre d'une solution.

En effet, les ions Cu^{2+} contenus dans la liqueur de Fehling et responsables de la couleur bleue sont transformés en ions Cu^+ par le sucre réducteur. Ces ions s'associent avec l'oxygène pour former de l'oxyde de cuivre (Cu_2O) qui donne un précipité rouge-brique. La liqueur de Fehling se décolore progressivement. Le dosage est terminé lorsque la couleur bleue disparaît. (**ANNEXE X**)

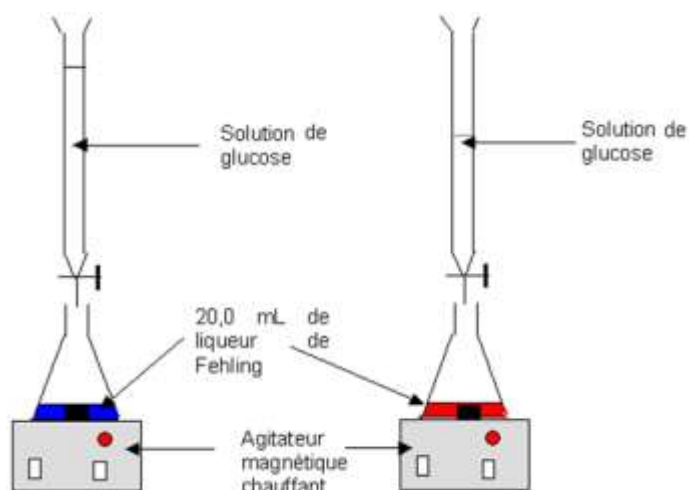
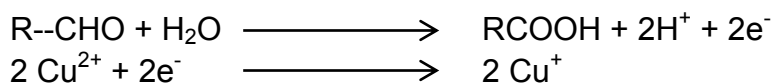
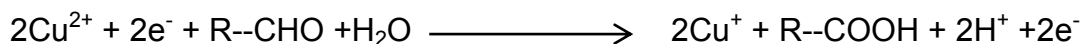


Figure 13 : Méthode de Fehling

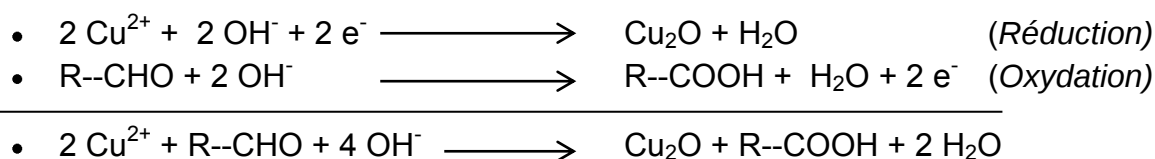
L'équation de la réaction s'écrit:

Demi-équations :



Bilan ionique :Bilan moléculaire :

L'équation- bilan de la réaction s'écrit :



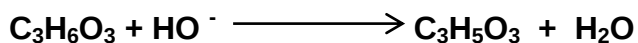
Cette réaction se manifeste par une modification de coloration de la solution, qui passe du bleu à une teinte rouge-brique.

1.2.6.3. Acide lactique (ANNEXE XI)

L'acide lactique est dosé par une méthode acidimétrique. Le but est de déterminer la concentration en acide lactique contenue dans le lactosérum déprotéiné.

Le principe consiste à déterminer l'acidité dosable par la soude en présence de phénolphtaléine comme indicateur.

On verse progressivement une solution de soude NaOH N/10 dans un volume $V_a = 10\text{ mL}$ de lactosérum déprotéiné. La réaction qui se produit entre l'acide $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ et la soude s'écrit :



On repère l'équivalence par le virage au rose de la phénolphtaléine. A l'équivalence, on a la relation $C_a \cdot V_a = C_b \cdot V_b$ qui permet la détermination de C_a concentration de l'acide et/ou la détermination du nombre de mole d'acide lactique (mM) contenu dans le lactosérum déprotéiné.

La formule suivante permet de calculer la quantité du lactate synthétisé en millimole (mM).

$$C_a \text{ (mM)} = 10 \times V_b$$

où

- ❖ C_a (mM) est le nombre de mole en mM de lactate
- ❖ C_b est la concentration d'hydroxyde de sodium : $C_b = 0.1 \text{ N}$
- ❖ V_b le volume équivalent, en mL, d'hydroxyde de sodium
- ❖ V_a est le volume du lactosérum déprotéiné : $V_a = 10 \text{ mL}$

CHAPITRE II : RESULTATS ET INTERPRETATIONS

2.1. Production du lactosérum à la Fromagerie de Bevalala

En général, la production varie selon la saison. Le flux mensuel du lait destiné à la fabrication du fromage en 2010 et en 2011 est représenté dans la figure 14 ci-dessous.

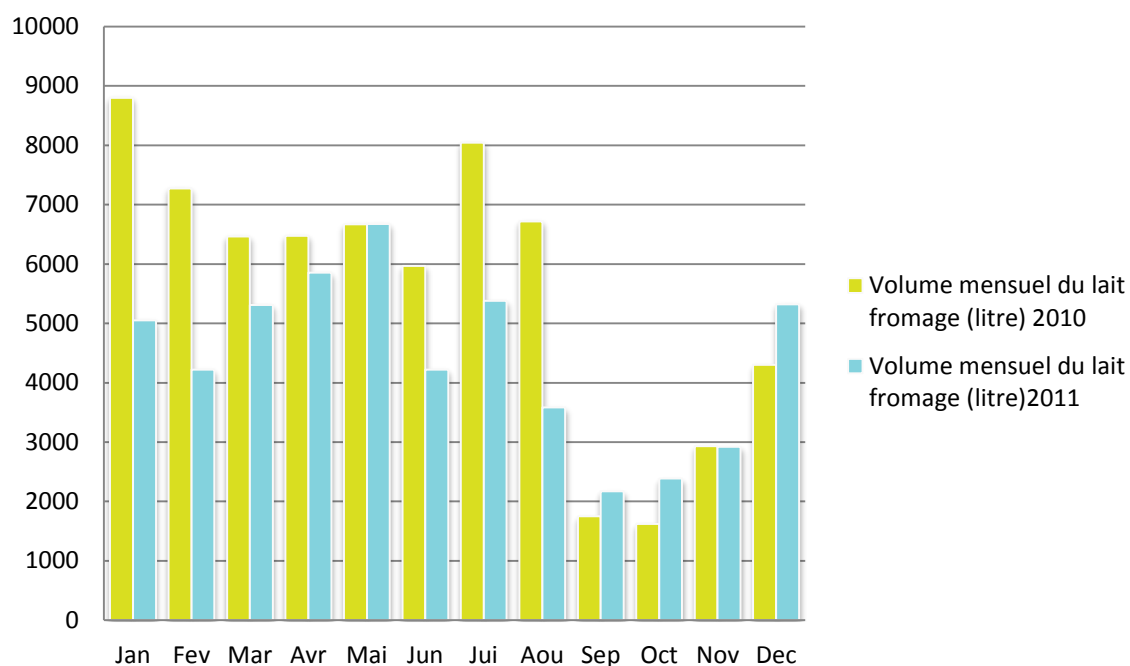


Figure 14 : Volume mensuel du lait converti en fromage entre 2010 & 2011
(Source document C.F.P.A.)

En moyenne, la production du lactosérum atteint 4 983 litres/mois.

2.2. Traitement du petit lait en milieu de culture

Avec la thermoprécipitation, le volume du lactosérum déprotéiné obtenu à partir d'un volume de lactosérum brut est donné par le tableau 9.

Tableau 9 : Volume du lactosérum avant et après thermoprécipitation

Paramètres	Unités	Valeurs
Lactosérum brut	(g)	101,26
Lactosérum déprotéiné	(g)	95,3

Ainsi, 4 983 litres de lactosérum par mois donnent théoriquement avec la thermoprécipitation 4 749 litres de lactosérum déprotéiné exploitable par mois soit 57 m³/an.

2.3. Bactéries lactiques

2.3.1. Activation des bactéries en état latent

Après 24 heures d'incubation, des colonies sont obtenues représentées par la figure 14 et 15.



Figure 15 : Témoin lait (BP 1)



Figure 16 : Activation des bactéries (BP 2)

On constate que l'ensemencement a déclenché un réveil des bactéries en état dormant pour passer à l'état végétatif, le milieu MRS Lactose étant un milieu sélectif.

Pour le témoin lait (BP1), on remarque l'apparition d'une trace de microorganisme qui se développe faiblement sur le milieu MRS Lactose.

Par contre, des colonies homogènes sont apparues sur la boîte de Pétri (BP2). Ces résultats confirment l'activation d'un seul type de bactérie. En plus, la prédominance dans la boîte nous confirme que ces colonies ne pourraient être que le résultat d'activation d'un seul type de bactérie dans le CHOOZIT MA 400-1. Mais pour vérifier cette hypothèse, il faut procéder à l'isolement.

2.3.2. Isolement

Pour vérifier l'activation, il faut s'assurer de la pureté de la souche activée, où l'on procède à l'ensemencement par épuisement d'une colonie plus ou moins isolée. Le résultat obtenu, après incubation est illustré par la figure 17.



Figure 17 : Isolement par épuisement

Le résultat affirme qu'on a obtenu une souche pure formée par un seul type de colonie. Or, théoriquement, cette unique colonie peut être attribuée à deux origines :

- ❖ Issue de la contamination du lait de vache pendant l'activation (à l'état de trace)
- ❖ Parmi les bactéries lactiques contenues dans le CHOOZIT MA 400-1

Afin de s'assurer de l'identité de la souche pure obtenue, l'identification est obligatoire.

2.3.3. Identification

L'identification ne devrait se faire qu'à partir d'une souche pure. Elle nécessite des observations macroscopique et microscopique.

❖ Observation macroscopique

A partir de la souche obtenue, la figure 18 présente quelques colonies isolées.

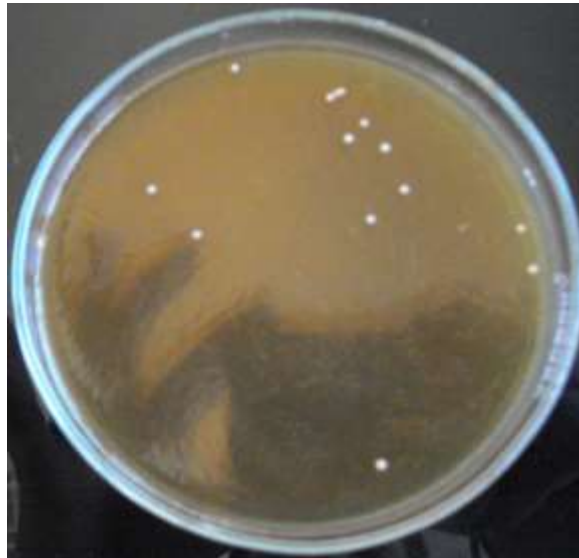


Figure 18 : Photo de colonies isolées

Les caractéristiques suivantes sont observées :

Allure des contours :	à bord lisse
Aspect de la surface :	Lisse
Coloration :	Blanchâtre
Consistance :	Crémeuse
Forme du relief :	Bombée
Taille :	Petite
Transparence :	Opaque

❖ Observation microscopique

Avec la coloration GRAM, le résultat de l'observation au microscope optique est donné par la figure 19.

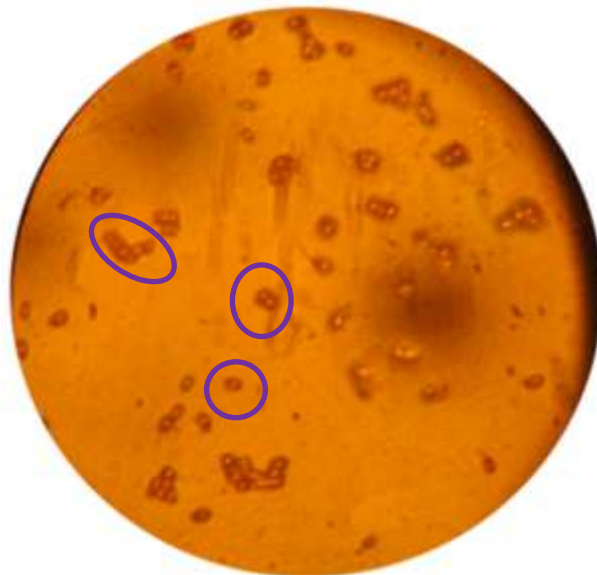


Figure 19 : *Lactococcus lactis* sous microscope optique (X100)

Les caractéristiques suivantes sont notées :

Coloration :	violette
Forme :	sphérique
Motilité :	immobile
Mode de groupement :	isolée, en paire, groupée en courte chaîne

A la suite de la coloration, les bactéries apparaissent violettes c'est-à-dire que la pureté de la souche est vérifiée. Cependant, les trois types de mode de groupement peuvent être attribués à la variation en sous espèces et variétés. Pour confirmer avec précision, ce dernier mérite encore une étude plus approfondie.

En un mot, l'identification nous a permis de confirmer que la souche isolée est de *Lactococcus lactis*.

2.4. Optimisation des paramètres physico-chimiques d'incubation (ANNEXE XII)2.4.1. Influence de la concentration initiale en lactose ($[S_0]$ en%)

A la température fixe de 37°C, les figures ci-dessous montrent l'évolution du lactate et de la biomasse en fonction du temps (32 heures) et en fonction de la concentration initiale en lactose.

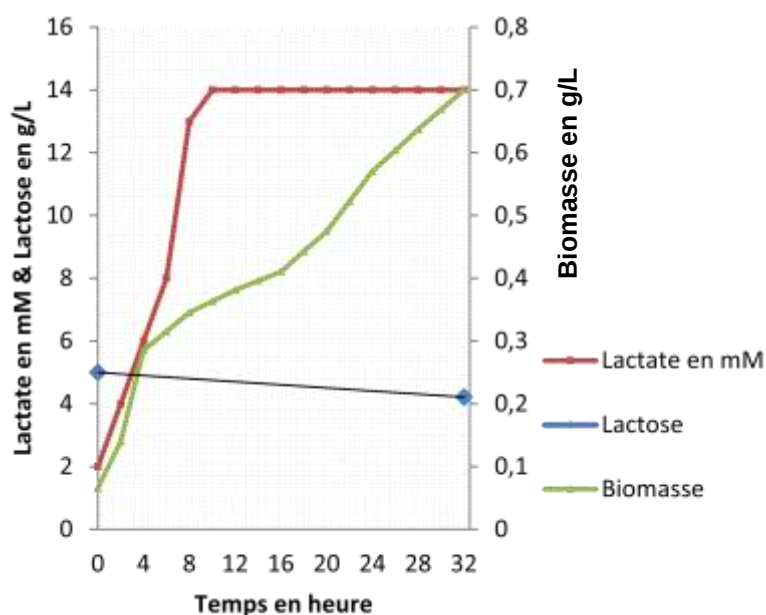


Figure 20 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_0] = 0,5\%$

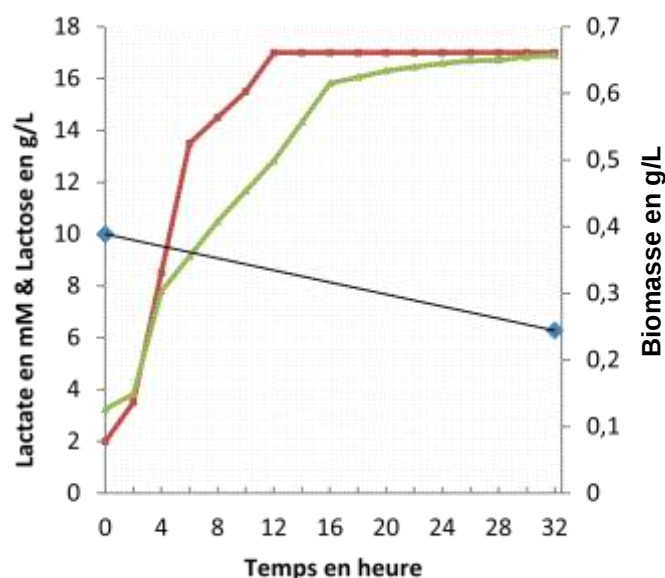


Figure 21 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_0] = 1\%$

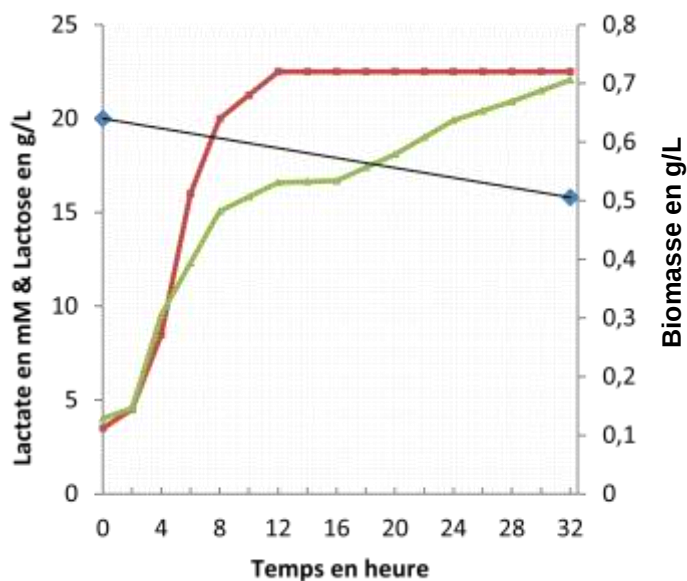


Figure 22 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_0] = 2\%$

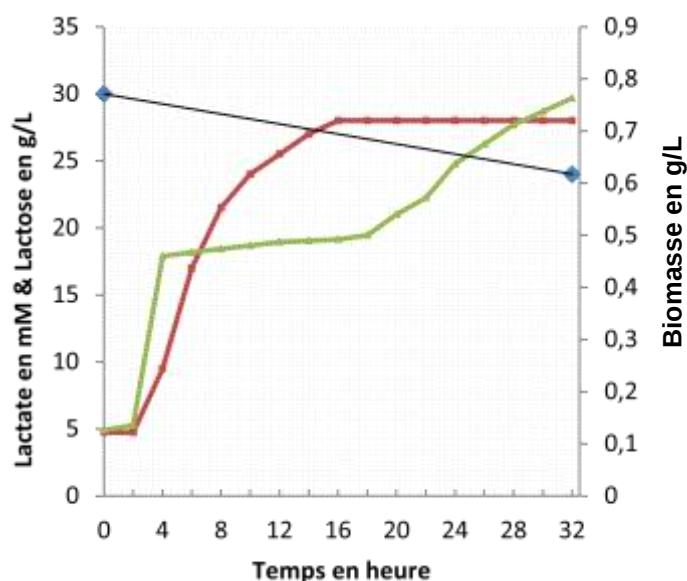


Figure 23 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[S_0] = 3\%$

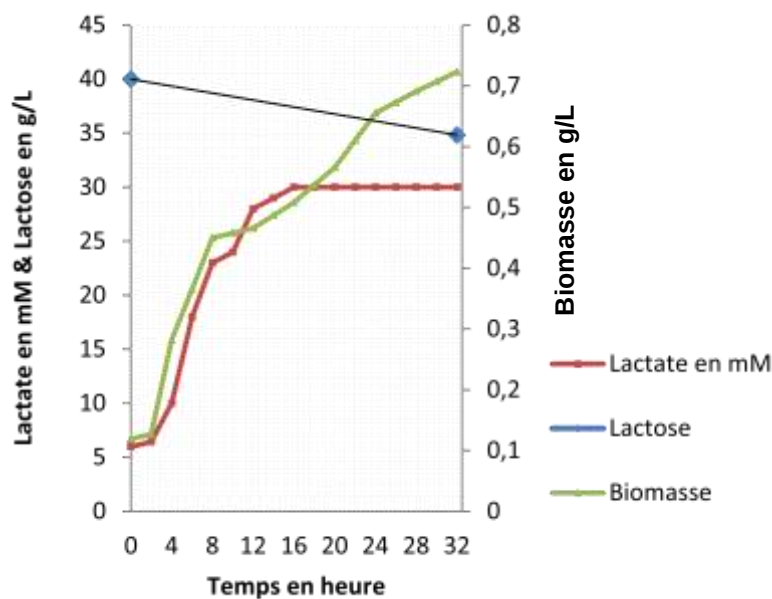


Figure 24 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[So] = 4\%$

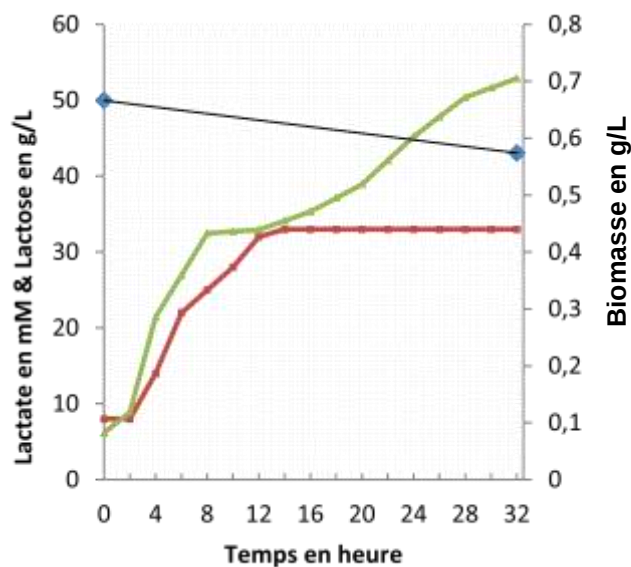


Figure 25 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[So] = 5\%$

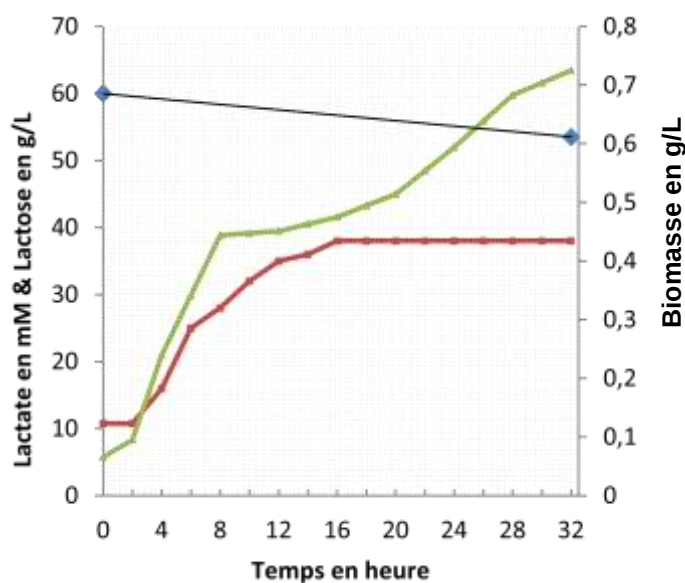


Figure 26 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[So] = 6\%$

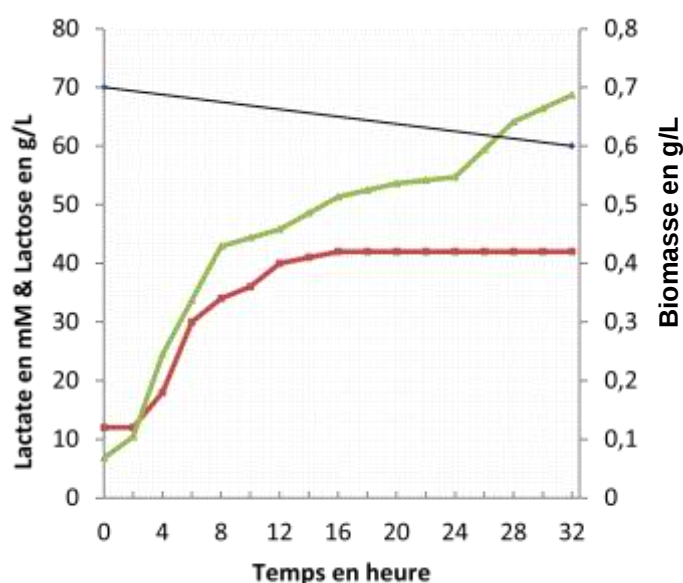


Figure 27 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec $[So] = 7\%$

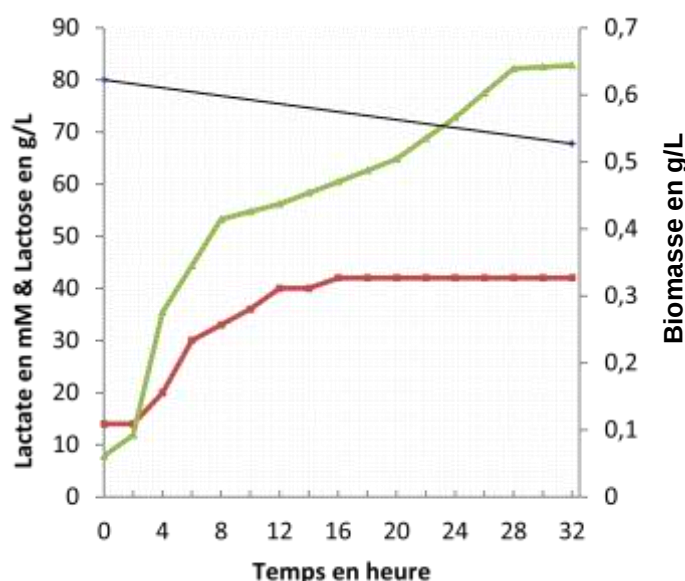


Figure 28 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 8%

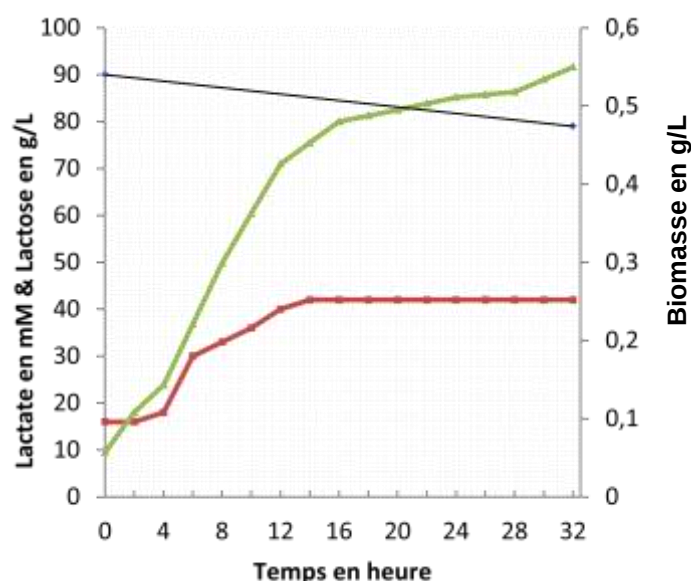


Figure 29 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 9%

Avec le lactosérum contenant une concentration initiale en lactose entre 0,5 à 9%, la biosynthèse de lactate varie du 2mM à 42mM. Elle diminue lorsqu'on descend de 7% à 0,5% (figure 20 à 26) et maximale avec une concentration initiale en lactose égale à 7% (figure 27). Au-delà de cette concentration, elle reste constante. (Figure 28 et 29). On rappelle que la concentration en lactose pour le lactosérum à l'état naturel est environ de 4%.

En outre, on note un arrêt de la biosynthèse du lactate après certains temps de la culture même si on prolonge la durée de l'incubation.

Parallèlement pour la biomasse, les résultats montrent que sa croissance évolue proportionnellement avec le temps et avec la concentration en substrat sauf avec le milieu lactosé à 9% (figure 29). Avec cette concentration, le lactose commence à limiter la croissance par excès de substrat.

On constate aussi que l'évolution de la biomasse présente une phase d'adaptation à partir du milieu lactosé de 3 à 9% (figure 23 à 29). A certain moment de la culture, la croissance continue alors que la biosynthèse du lactate s'arrête.

A la fin de l'incubation, le substrat n'est pas totalement épuisé (figure 20 à 29). Le milieu accumule une quantité de substrat résiduel non négligeable. Alors, on peut dire que l'arrêt de la production n'est pas dû à l'épuisement du substrat.

Le tableau 10 résume les résultats obtenus parallèlement avec la vitesse moyenne d'acidification.

❖ **Tableau 10: Tableau récapitulatif pour l'évolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification $V_{m,ac}$, du taux de conversion $Y_{P/S}$ et de la biomasse correspondante en fonction du $[S_0]$**

[Lactose] (%)	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lactate (mM)	14	17	22,5	28	30	33	38	42	42	42
$V_{m,ac}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,12	0,12	0,16	0,15	0,16	0,21	0,21	0,23	0,23	0,27
Biomasse g.L ⁻¹	0,34	0,49	0,53	0,49	0,50	0,45	0,47	0,51	0,47	0,45
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,158	0,372	0,21	0,20	0,13	0,14	0,11	0,143	0,153	0,122

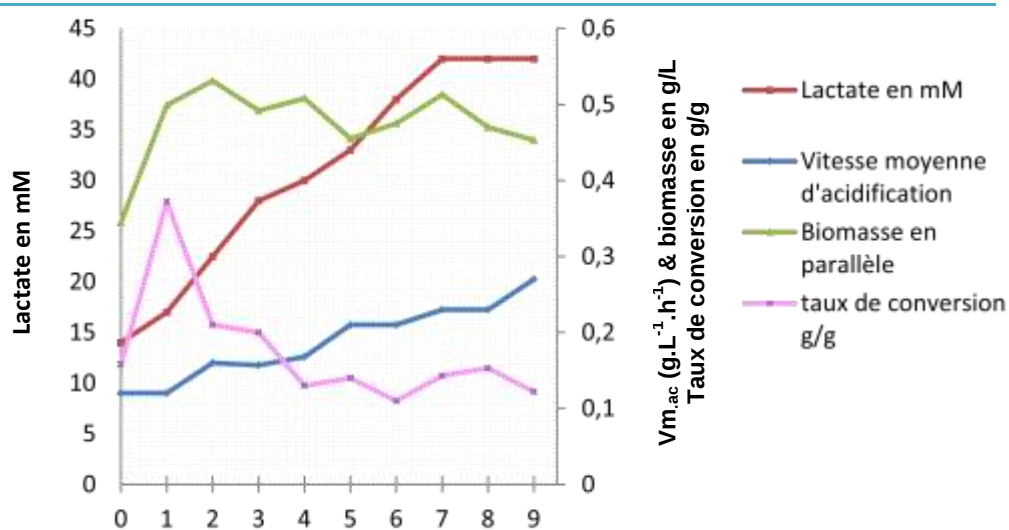


Figure 30 : Récapitulation du lactate en fonction du $[S_0]$ variable

L'examen du tableau 10 et de la figure 30 met en exergue que la vitesse moyenne d'acidification est proportionnelle à la concentration initiale en lactose et avec la croissance en biomasse. Outre le résultat issu de $[S_0] = 0,5\%$, la quantité de biomasse en parallèle à l'arrêt de la biosynthèse du lactate se situe auprès de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Cependant, elle n'est pas proportionnelle à la quantité du lactate synthétisé. Il se peut que la concentration en biomasse $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ dans le lactosérum déprotéiné est limitante pour la synthèse du lactate.

Pour conclure, la concentration initiale en lactose influe sur la croissance de *Lactococcus lactis* et sur la biosynthèse du lactate. Cette dernière est optimale avec une concentration initiale en lactose égale à 7% qui permet la synthèse de 42mM de lactate. On peut aussi dire qu'une forte concentration en substrat inhibe la croissance (9%). Avec un substrat dilué (0,5% à 3%), la biosynthèse du lactate est immédiate. Aussi, l'arrêt de la production n'est pas dû à l'appauvrissement du milieu en substrat, ni à l'arrêt de la croissance mais avec d'autres paramètres qui mérite d'être étudiés. Ceci nous amène au paramètre suivant.

2.4.2. Influence de l'agitation

En microbiologie, l'agitation est un facteur complémentaire qui assure le transfert des éléments du milieu de culture aux cellules. La température étant fixée à 37°C, et la concentration en substrat à 7% en lactose. Les figures suivantes représentent l'influence de la production du lactate, de biomasse, du lactose en fonction de l'agitation (rpm) et du temps (h).

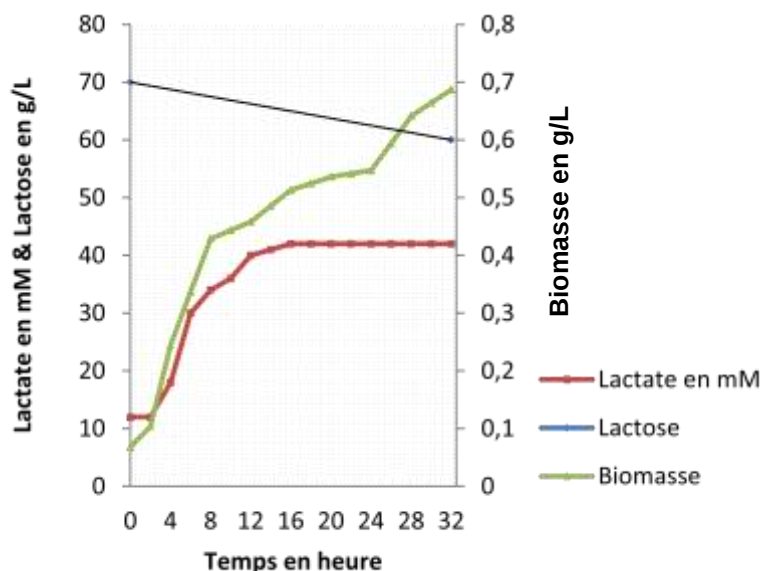


Figure 31 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 0 rpm

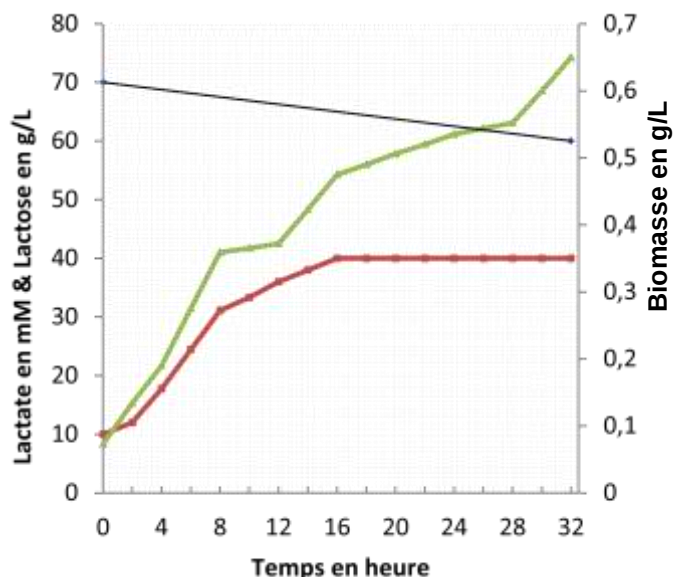


Figure 32 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 10 rpm

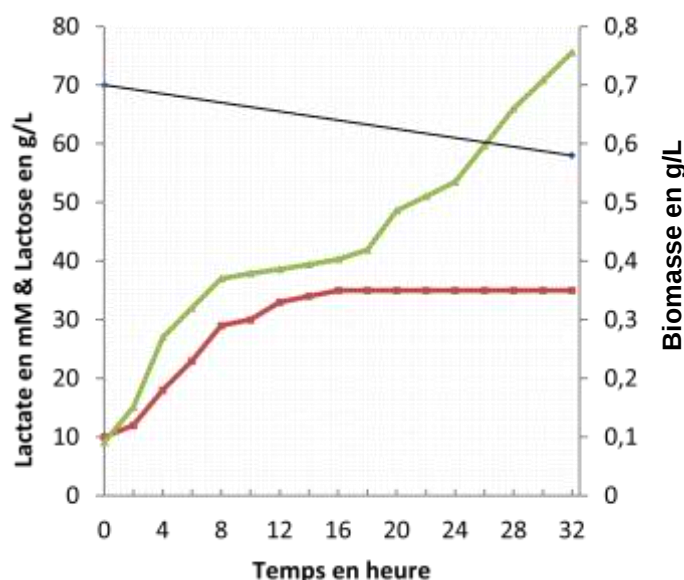


Figure 33 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 15 rpm

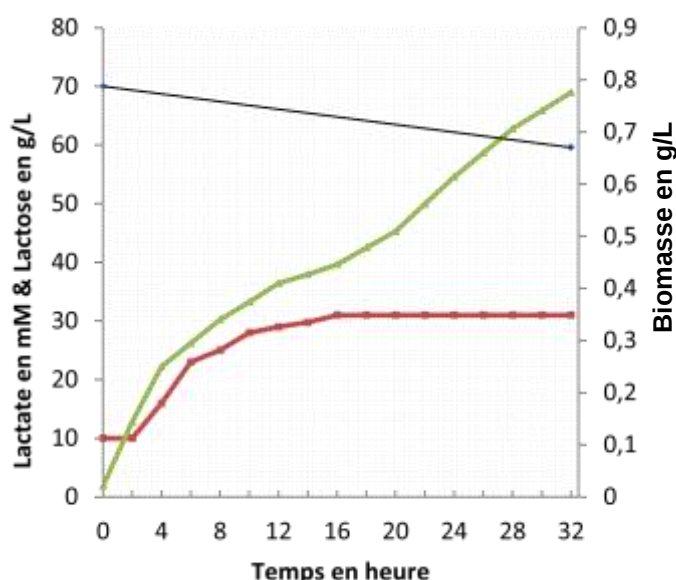


Figure 34 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 20 rpm

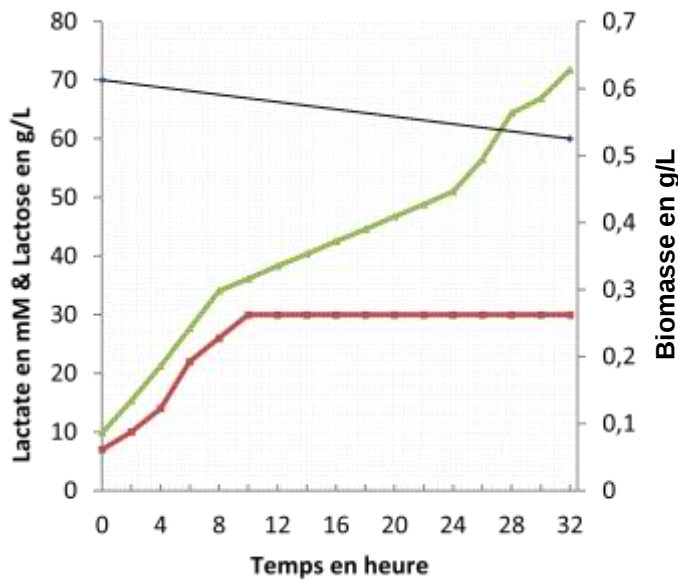


Figure 35 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 25 rpm

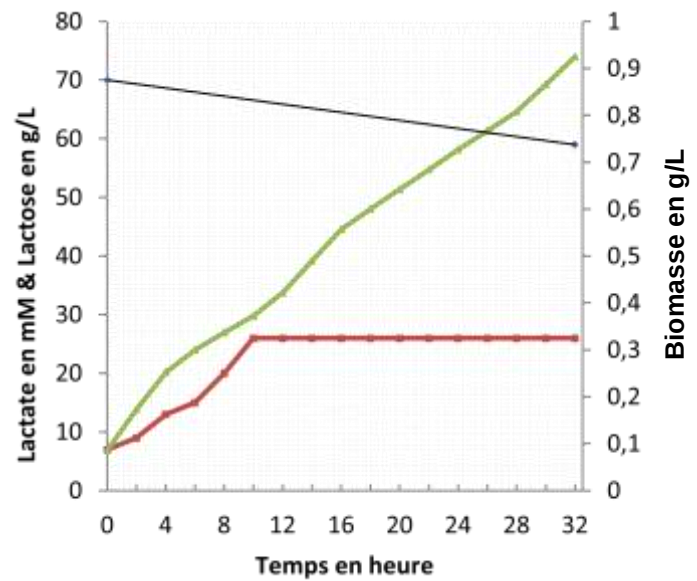


Figure 36 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 50 rpm

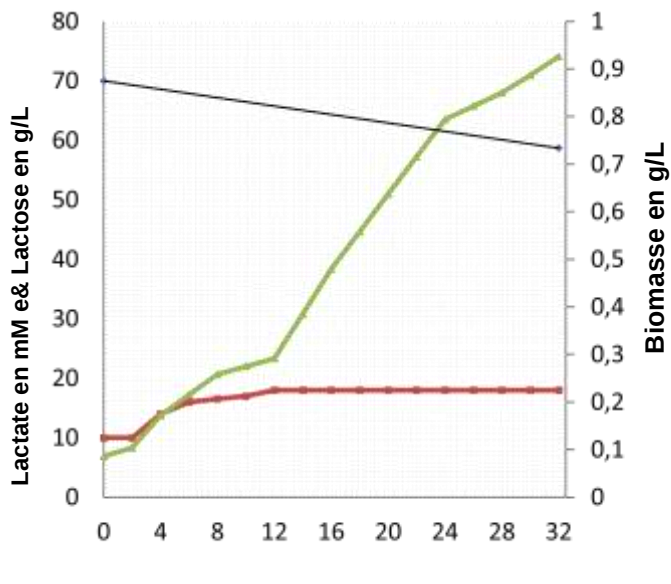


Figure 37 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 75 rpm

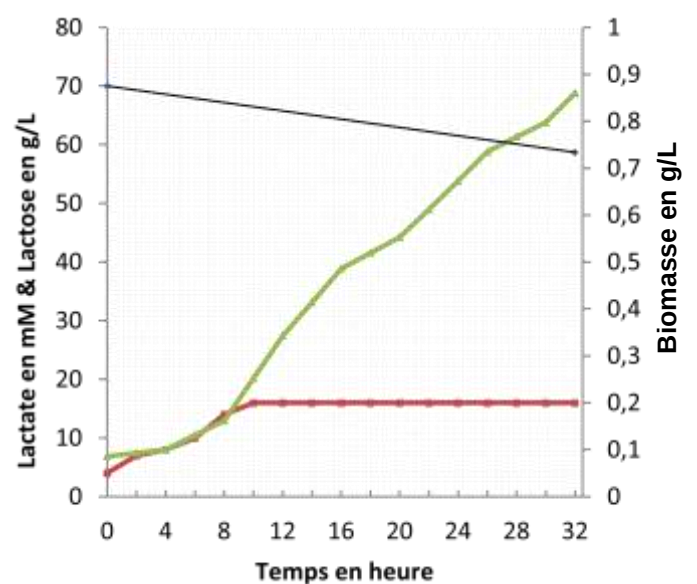


Figure 38 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 100 rpm

D'après ces résultats, la biosynthèse du lactate avec un milieu agité de 10 à 100 rpm, varie de 40mM à 16mM. Elle est inversement proportionnelle avec la vitesse de l'agitation (figure 32 à 38). On note l'arrêt de la biosynthèse après certains temps de la culture même si on prolonge la durée de l'incubation.

Simultanément pour la biomasse, elle évolue proportionnellement avec le temps et avec la vitesse d'agitation. Elle varie du 0,65 à 0,92g.L⁻¹.

Pendant l'incubation, on constate aussi que la croissance continue alors que la biosynthèse du lactate cesse.

A la fin de l'incubation, le substrat n'est pas totalement épuisé. Le milieu en contient encore une quantité non négligeable allant de 58 à 60 g.L⁻¹. Alors, on peut dire que l'arrêt de la synthèse du lactate n'est pas dû à l'épuisement du substrat. Le tableau 11 résume les résultats obtenus.

Tableau 11: Tableau récapitulatif pour l'évolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification $V_{m.ac}$, du taux de conversion $Y_{P/S}$ et de la biomasse correspondante en fonction de l'agitation

Agitation (rpm)	0	10	15	20	25	50	75	100
Lactate (mM)	42	40	35	31	30	26	18	16
Vitesse moyenne d'acidification g/L.h	0,23	0,22	0,19	0,17	0,27	0,23	0,13	0,12
Biomasse g.L ⁻¹	0,51	0,47	0,40	0,44	0,31	0,37	0,29	0,25
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,143	0,143	0,171	0,15	0,143	0,157	0,161	0,161

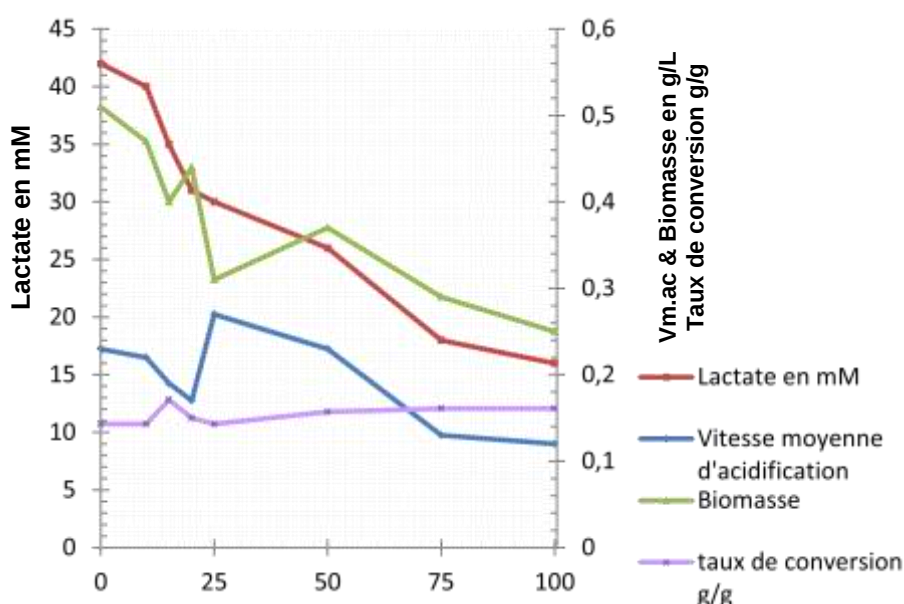


Figure 39 : Evolution du lactate, de la $V_{m.ac}$ et de la biomasse correspondante en fonction de l'agitation

D'après ces résultats, la vitesse moyenne d'acidification est maximale avec une vitesse d'agitation de 25 rpm (figure 39). Au-delà de cette valeur, la vitesse diminue. Quant à la production de biomasse et du lactate, elles décroissent au fur et à mesure que la vitesse d'agitation augmente. D'une manière générale, l'agitation du milieu a un effet inhibiteur sur la synthèse du lactate.

Or théoriquement, l'agitation augmente la distribution de la quantité d'oxygène transféré, assure l'homogénéisation du milieu et la distribution spatiale des substrats. <13>

Tous ceci pourraient améliorer la consommation du substrat par les bactéries, et aussi de minimiser l'effet du pH.

D'après les résultats expérimentaux obtenus, l'agitation aurait plutôt un effet inhibiteur sur la biosynthèse du lactate et un effet stimulateur sur la production de biomasse après l'arrêt de la synthèse du lactate.

L'inhibition de la biosynthèse du lactate peut être liée à l'augmentation de la quantité d'oxygène dissoute. Rappelons que *Lactococcus lactis* est une bactérie anaérobie-facultatif c'est-à-dire qu'elle n'est pas capable d'utiliser l'oxygène mais se multiplie en sa présence. [11] Alors, le fait d'augmenter l'oxygène dissoute dans le milieu diminue la biosynthèse du lactate car l'oxygène bloque l'action de certains enzymes nécessaires à la synthèse du lactate. En plus, la présence d'oxygène dans le milieu stimule la respiration d'où l'accroissement de la production de biomasse au fur et à mesure que l'agitation est importante.

On peut aussi déduire que toute opération qui diminue la quantité d'oxygène dissoute stimulera la synthèse du lactate.

En guise de conclusion, l'agitation a un effet négatif sur la production du lactate. Cependant, elle possède un effet positif sur la production de biomasse. Cette dernière pourrait être exploitée pour produire des bactéries lactiques à partir du lactosérum.

2.4.3. Influence de la température

Comme tout être vivant, la température possède un rôle primordial sur la croissance d'où la nécessité de l'étudier. Les figures suivantes montrent l'évolution du lactate, de la biomasse et du lactose en fonction de la température.

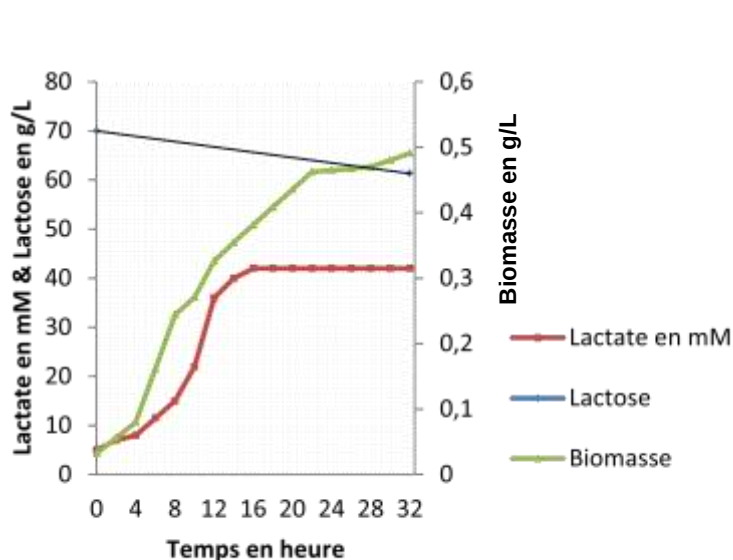


Figure 40 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 25°C

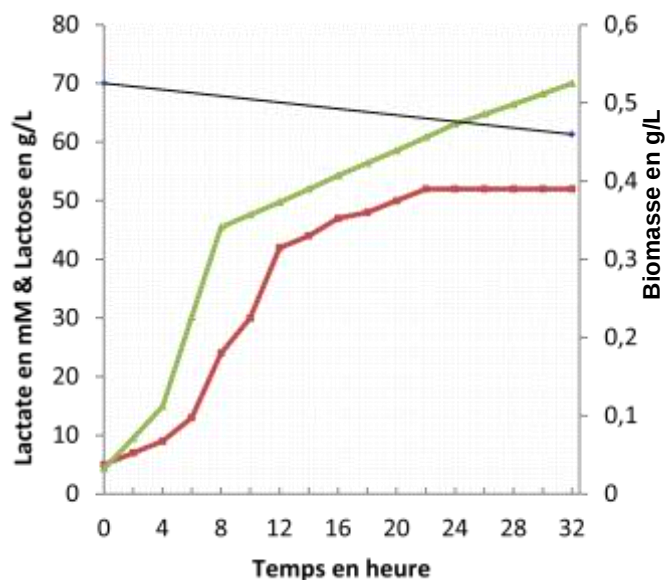


Figure 41 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 30°C

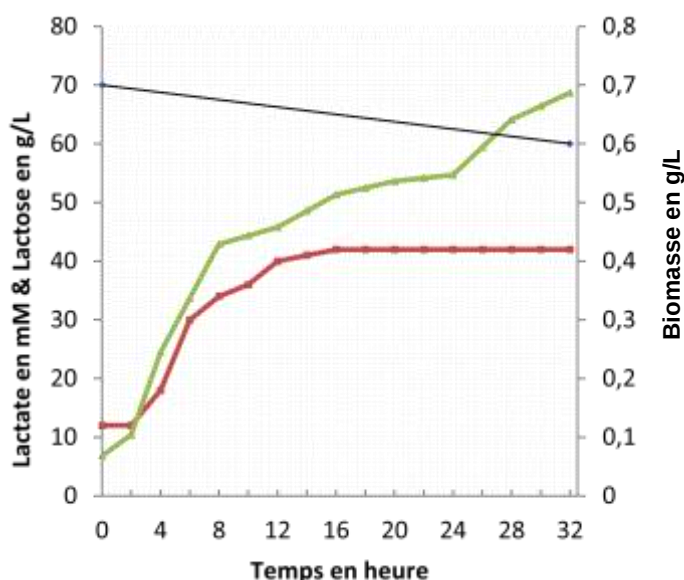


Figure 42 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 37°C

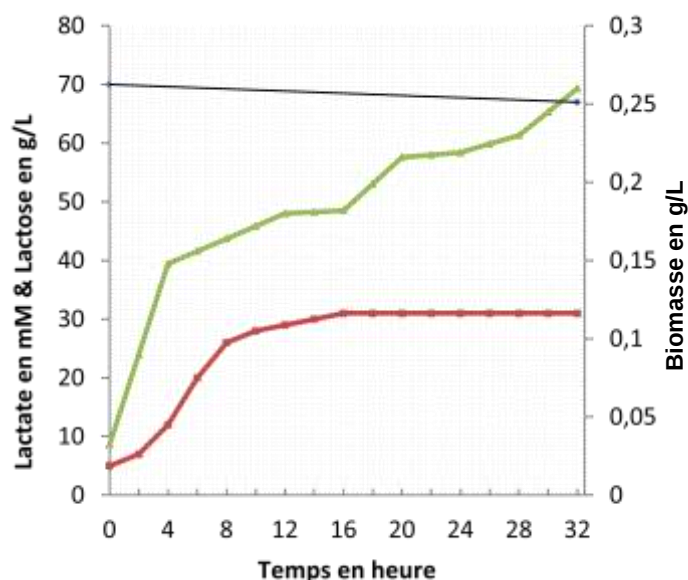


Figure 43 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 42°C

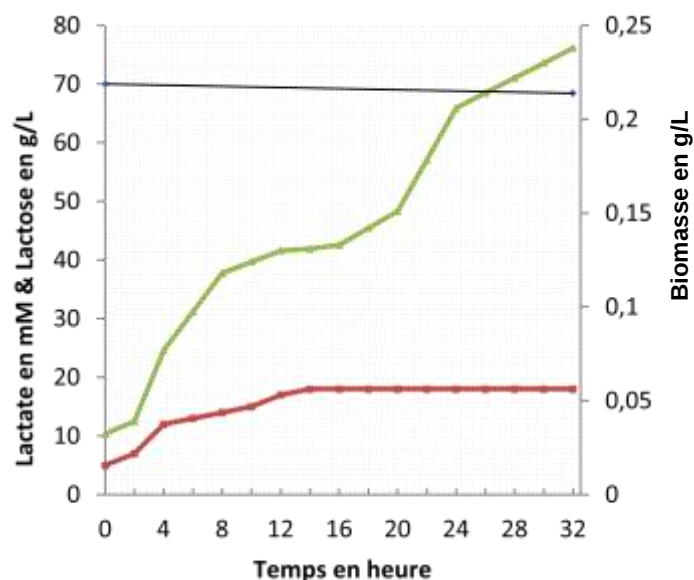


Figure 44 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température $t = 45^{\circ}\text{C}$

D'après les résultats, la synthèse du lactate est maximale à la température 30°C . Cette température permet de synthétiser 52 mM de lactate à partir d'un milieu lactosé à 7%. Les figures 40 à 44 montrent que le lactate synthétisé diminue si on abaisse ou si on élève la température au-delà de 30°C . On note un arrêt de la biosynthèse après un certain temps de culture même si on prolonge la durée de l'incubation.

Pour la biomasse, on constate que la température entre 25 et 37°C convient au développement de *Lactococcus lactis* sur le lactosérum déprotéiné. Les figures 40 à 42 montrent que la valeur passe de $0,491$ à $0,687 \text{ g.L}^{-1}$. A partir de 42°C , figures 43 et 44, l'évolution de la biomasse diminue au fur et à mesure que la température augmente.

A la fin de la culture, le substrat n'est pas épuisé pour chaque température étudiée. Le milieu en contient encore une quantité non négligeable. Alors, on peut dire que l'arrêt de la production du lactate n'est pas dû à l'épuisement du substrat.

Le tableau 12 résume les résultats obtenus avec la vitesse moyenne d'acidification $V_{m,ac}$.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif pour l'évolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification, du taux de conversion $Y_{P/S}$ et de la biomasse correspondante en fonction de la température

Température (°C)	25	30	37	42	45
Lactate (mM)	42	52	42	31	18
Vitesse moyenne d'acidification g/L.h	0,21	0,19	0,23	0,15	0,11
Biomasse g.L ⁻¹	0,38	0,47	0,51	0,19	0,13
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,123	0,123	0,143	0,042	0,022

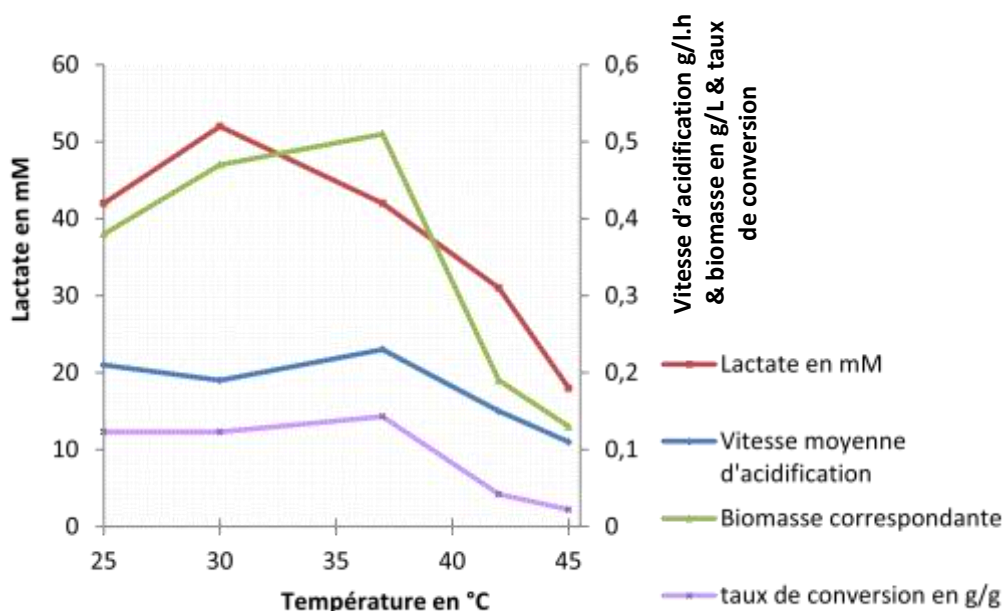


Figure 45 : Evolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification $V_{m.ac}$ et de la biomasse correspondante en fonction de la température

Selon la figure 45, on observe que la vitesse moyenne d'acidification atteint une valeur maximale à la température 37°C. Il en est de même pour la biomasse. Cependant, la synthèse maximale de lactate maximale se situe à la température 30°C.

Ainsi, la température 37°C stimule la production de biomasse (0,51 g.L⁻¹) et accélère la synthèse du lactate ($V_{m.ac}$ 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹). On peut dire que la majorité des enzymes catalysant la synthèse du lactate fonctionne à 37°C. Ici, elle stimule la vitesse de la réaction. Autrement dit, l'activité microbienne augmente avec la production de biomasse à la température 37°C.

A la température 30°C, la production de biomasse et la vitesse moyenne d'acidification est inférieure à celles d'obtenues à 37°C (0,47 g.L⁻¹ pour la biomasse et 0,19 g.L⁻¹.h⁻¹ pour l'acidification). Or, la synthèse du lactate est supérieure à celle obtenue à 37°C (52 mM). Ainsi, la température optimale pour la production du lactate est 30°C.

A la température de 25°C, il y a production de biomasse et synthèse de lactate mais avec des valeurs plus faibles. A cette température, on peut dire que l'activité enzymatique n'est pas optimale.

A partir de 42°C, la faible production de biomasse et de lactate est liée à l'augmentation de la vitesse de dénaturation des protéines (enzymes) qui influe sur l'activité métabolique.

En guise de conclusion, la température optimale pour la production du lactate est 30°C. Ceci confirme que la souche étudiée est bien de *Lactococcus lactis*, souche mésophile. L'activité acidifiante est stimulée à 30°C et celle de la croissance à 37°C.

2.4.4. Influence de la quantité de l'inoculum

La quantité de l'inoculum influe sur la croissance bactérienne et aussi sur le métabolisme d'où la nécessité de l'optimiser. Les figures suivantes montrent l'évolution du lactate, de la biomasse et du lactose en fonction du temps et de la quantité initiale d'inoculum.

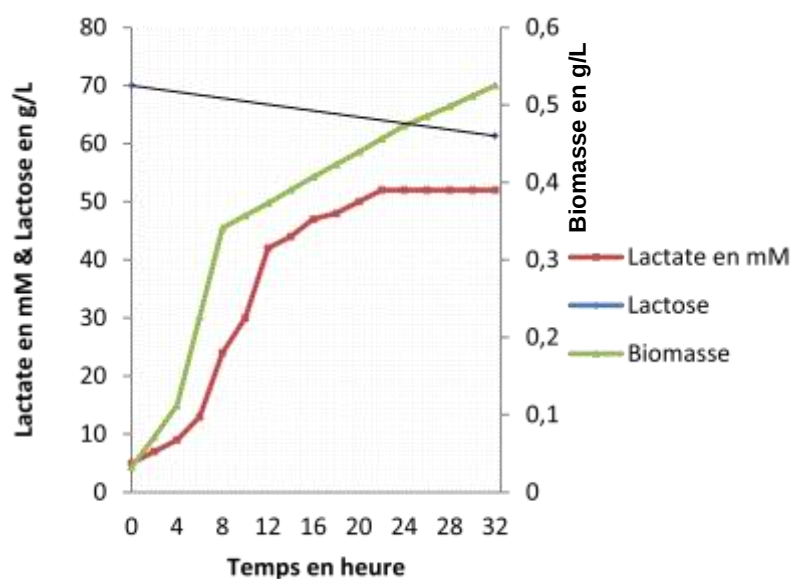


Figure 46 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (10%)

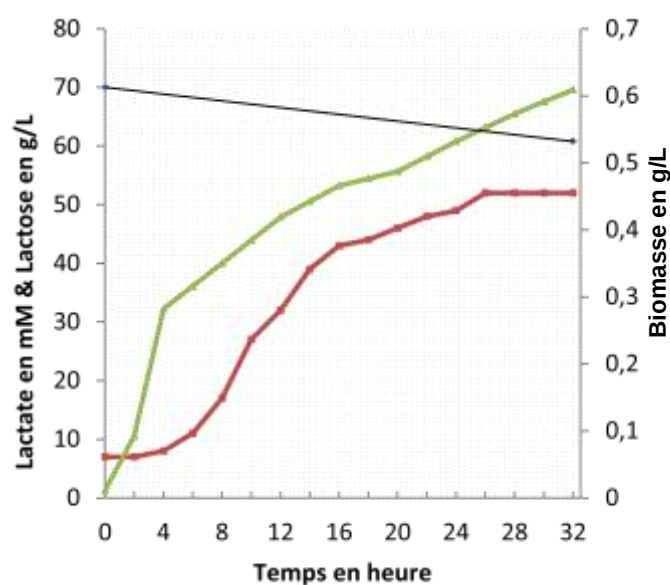


Figure 47 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (7,5%)

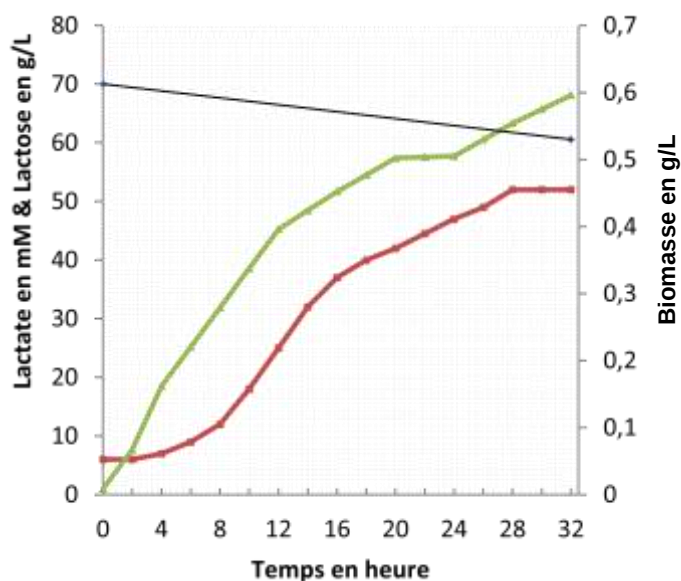


Figure 48 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (5%)

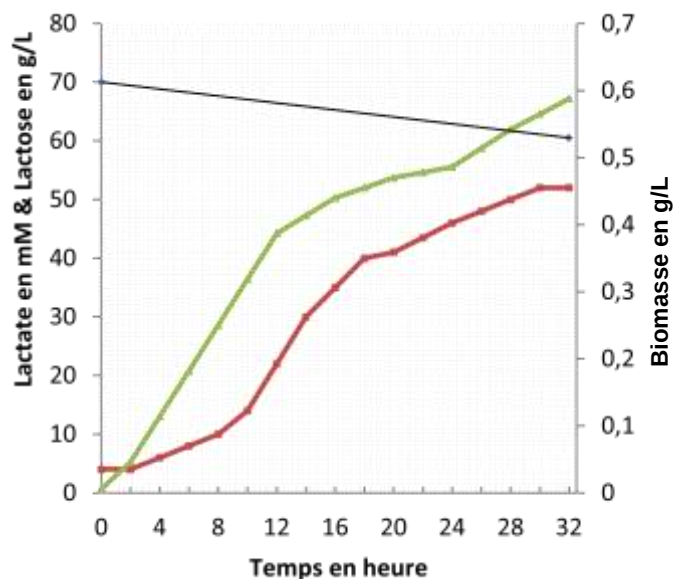


Figure 49 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (3,5%)

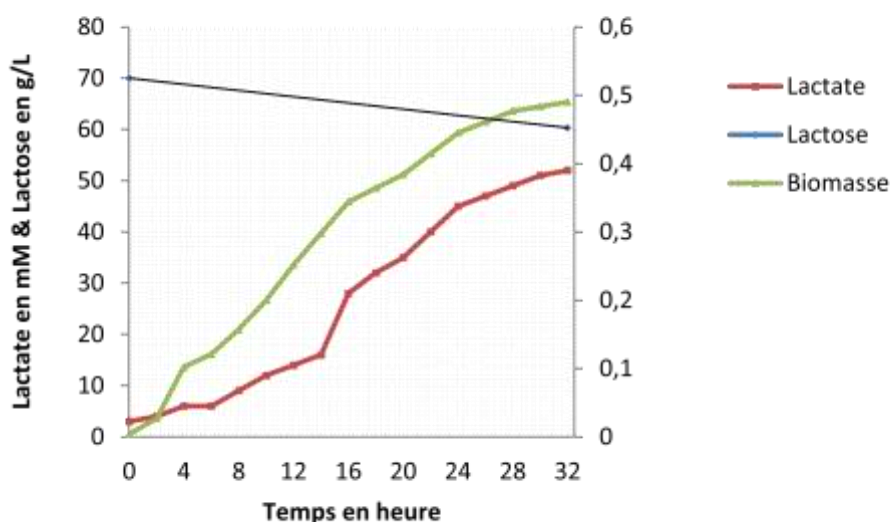


Figure 50 : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (1%)

D'après les figures 46 à 50, la synthèse du lactate n'est pas fonction de la quantité initiale d'inoculum. On obtient le même résultat (52 mM) avec le milieu inoculé à 10%, à 7,5%, à 5%, à 3,5% et à 1%. On note que l'évolution de la synthèse du lactate est progressive et proportionnelle à la quantité de l'inoculum. Mais, elle s'arrête tous dès que la quantité de lactate synthétisée atteint 52mM même si on prolonge la durée de l'incubation.

Pour la biomasse, Les figures 46 à 50 montrent que sa valeur est proportionnelle à la quantité de l'inoculum. Elle augmente au fur et à mesure avec le temps même si la synthèse du lactate cesse.

A la fin de la culture, le substrat n'est pas épuisé pour chaque milieu inoculé. Le milieu en contient encore une quantité non négligeable. Alors, on peut dire que l'arrêt de la production du lactate n'est pas dû à l'épuisement du substrat.

Le tableau 13 résume les résultats obtenus parallèlement avec la vitesse moyenne d'acidification.

Tableau 13 : Evolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification $V_{m,ac}$, du taux de conversion $Y_{P/S}$ et de la biomasse correspondante en fonction de la quantité de l'inoculum

Inoculum (%)	1	3,5	5	7,5	10
Lactate (mM)	52	52	52	52	52
Vitesse moyenne d'acidification g/L.h	0,14	0,15	0,16	0,16	0,23
Biomasse g.L ⁻¹	0,49	0,56	0,55	0,57	0,51
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,123	0,131	0,135	0,135	0,138

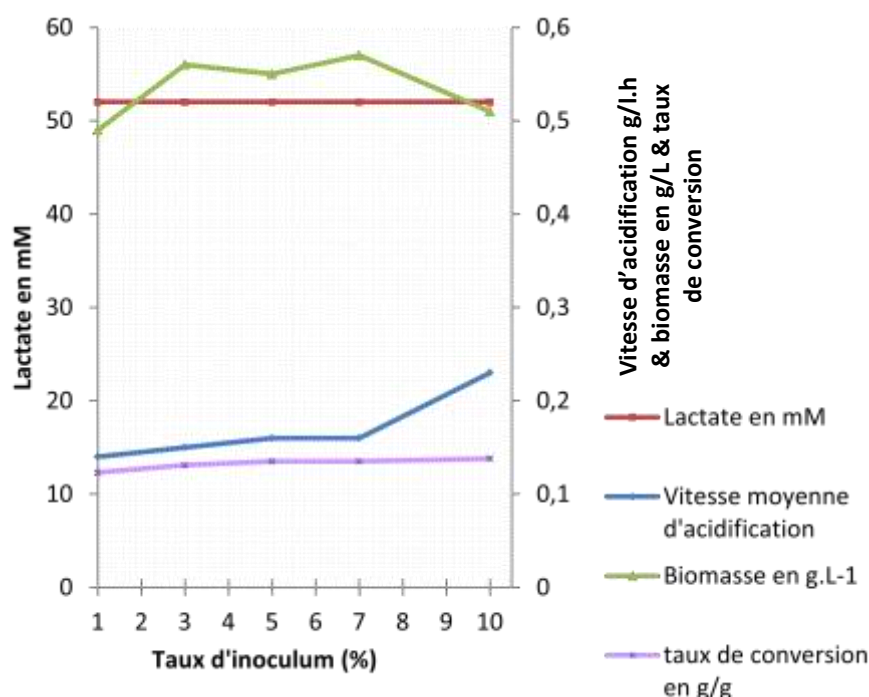


Figure 51 : l'évolution du lactate, de la vitesse moyenne d'acidification $V_{m,ac}$ et de la biomasse correspondante en fonction de la quantité de l'inoculum

On observe que la vitesse moyenne d'acidification est proportionnelle avec la quantité de l'inoculum. Ce qui veut dire qu'avec le milieu inoculé à 10 %, la vitesse moyenne d'acidification est importante que celui avec du milieu inoculé à 1%.

La quantité de biomasse au niveau de l'arrêt de la biosynthèse du lactate se situe en général auprès de $0,53 \text{ g.L}^{-1}$. A la fin de la culture, la production de biomasse est plus importante avec le milieu inoculé à 10%, ce qui veut dire que quand le milieu de culture devient défavorable à la vie des bactéries les substances issues du milieu de préculture contribuent à la croissance.

C'est pourquoi la biomasse dans le milieu inoculé à 1% est handicapée dans sa croissance par rapport à celle du milieu à 10%.

La faible production de biomasse est liée à l'accumulation du lactate dans le milieu qui influe sur l'activité métabolique notamment sur l'activité enzymatique en abaissant le pH. Ainsi, ce paramètre mérite une étude plus approfondie.

En guise de conclusion, la quantité de l'inoculum n'influe pas sur la synthèse du lactate. On obtient le même résultat avec le milieu inoculé à 10%, à 7,5%, à 5%, à 3,5% et à 1%. Plutôt, elle influe sur la croissance. L'activité acidifiante s'arrête quand la quantité de lactate atteint 52mM. De ce fait, il est préférable d'utiliser l'inoculum à 1% pour la production de lactate.

2.5. Production d'acide lactique avec les conditions optimales

2.5.1. Etude de la cinétique de croissance de *Lactococcus lactis*

Avec les paramètres optimisés dont :

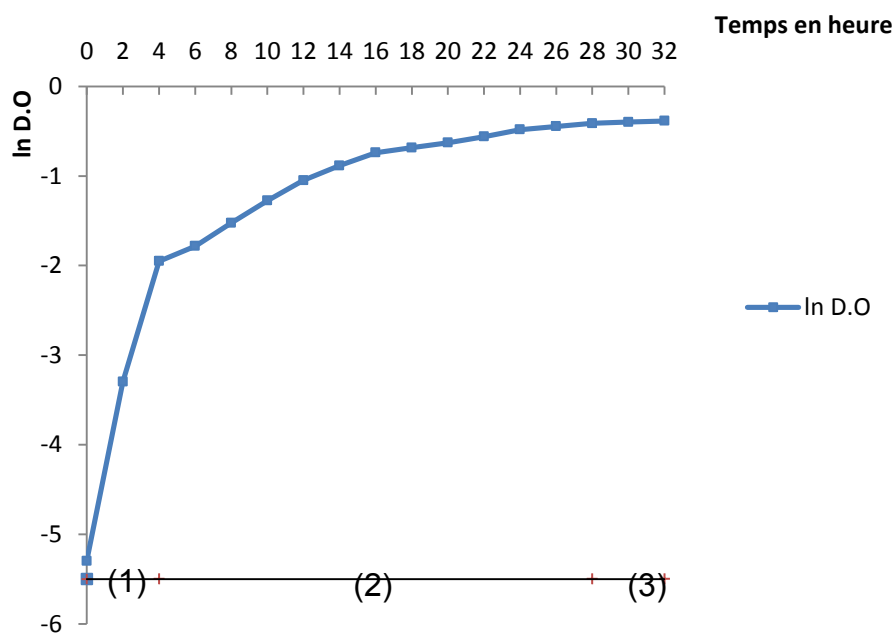
- ❖ La concentration initiale en substrat (7%)
- ❖ La température (30°C)
- ❖ La quantité de l'inoculum (1%)

La cinétique de croissance de *Lactococcus lactis* dans le lactosérum déprotéiné est suivie avec la courbe $\ln D.O = f(t)$. Le tableau 14 récapitule la valeur moyenne des résultats obtenus.

Tableau 14 : Valeur moyenne de la densité optique avec le milieu inoculé à 1%

Temps (h)	D.O à 580 nm	ln D.O
0	0,005	-5,298
2	0,037	-3,296
4	0,142	-1,951
6	0,168	-1,783
8	0,218	-1,523
10	0,279	-1,276
12	0,350	-1,049
14	0,413	-0,884
16	0,477	-0,740
18	0,505	-0,683
20	0,533	-0,629
22	0,571	-0,560
24	0,618	-0,481
26	0,640	-0,446
28	0,662	-0,412
30	0,671	-0,398
32	0,680	-0,385

La figure 52 permet d'apprécier la cinétique de croissance de *Lactococcus lactis*.

**Figure 52 : Courbe de croissance de *Lactococcus lactis***

2.5.2. Délimitation des phases

❖ Phase (1) (Temps : 0 – 4h)

La courbe présente une phase (1) délimitée entre $t = 0$ à 4 heures. Pendant cette phase, la représentation $\ln D.O = f(t)$ permet directement d'obtenir une zone linéaire où toutes les cellules se multiplient activement avec le temps et atteint un plateau maximal. De ce fait, cette phase est attribuée à la **phase exponentielle de croissance**.

On constate ainsi l'absence de la phase de latence. Le milieu de préculture et le lactosérum déprotéiné sont différents (substrat : glucose/lactose), on peut donc affirmer que la phase de latence existe mais avec une durée brève et les cellules en préculture s'adaptent faiblement à leur nouvel environnement en synthétisant les enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose dans le milieu. En plus, l'incubation pendant 12 heures de l'inoculum en phase exponentielle contribue à la réduction du temps de latence.

La phase exponentielle dure quatre heures. Le taux de croissance est maximal. Cela s'explique que le milieu de production ne dispose pas tous les facteurs de croissance pour *Lactococcus lactis* d'où la croissance est très limitée. Ce dernier mérite une étude plus approfondies.

❖ Phase (2) (Temps : 4 – 28h)

Elle dure pendant 26 heures et se caractérise par une inclinaison de la $\ln D.O = f(t)$ à la suite de la phase exponentielle. Or l'inflexion de la courbe traduit une diminution de la vitesse de croissance c'est-à-dire que la croissance se poursuit avec le temps mais avec une amplitude plus faible. Alors, cette phase correspond à la **phase de ralentissement**.

On peut dire donc que pendant la phase de ralentissement, la production de biomasse est moins importante par rapport à la production de lactate à t (4 – 22 heures) (figure 51 et figure 52). Cela confirme la carence en facteur de croissance pour stimuler la croissance et la présence des facteurs d'inhibitions surtout l'accumulation du lactate dans le milieu.

À t (22 – 28 heures), la croissance ralentit au fur et à mesure avec le temps. La concentration en acide lactique devient de plus en plus importante entraînant la diminution du pH qui est à l'origine de l'arrêt progressive de la croissance.

❖ Phase (3) (Temps : 28 – 32 h)

Durant cette phase, la courbe $\ln D.O=f(t)$ tend vers un plateau. Parallèlement, la croissance est quasiment nulle c'est dire que le nombre de cellules viables restent à peu près constant. D'où, cette phase est attribuée à un début de **la phase stationnaire**. Le ralentissement de la croissance est dû à l'accumulation de l'acide lactique qui élève à son tour le pH. Ce dernier inhibe l'activité enzymatique à l'origine de l'arrêt de la croissance. Le pH joue un rôle primordial et mérite une étude plus approfondie pour améliorer le résultat.

2.5.3. Calcul des paramètres de croissance

2.5.3.1. La vitesse spécifique de croissance μ

Elle est calculée pendant la phase exponentielle de croissance.

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

N_2 : nombre d'individus dans la population à temps t_2 en phase exponentielle

N_1 : nombre d'individus dans la population à temps t_1 en phase exponentielle

μ : vitesse spécifique de croissance en h^{-1}

$$\mu = (-3,296 + 5,298) / (2 - 0)$$

$$\mu = 1,001 h^{-1}$$

La vitesse spécifique permet de comparer le comportement de souches différentes placées dans des conditions analogues.

2.5.3.2. Le temps de génération G

Elle est calculée pendant la phase exponentielle de croissance.

$$G = 1 / \mu$$

$$G = 1 / 1,001$$

$$G = 1 h$$

Alors, le temps nécessaire au doublement de la biomasse est une heure.

2.5.3.3. Rendement de biomasse par rapport à la consommation du substrat (%)

Elle est calculée pour une phase donnée de la croissance.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta \text{D.O} \times \text{unité d'absorption}}{\Delta S} \times 100$$

$$Y_{X/S} = \frac{0,68 - 0,005 \times 0,72}{70 - 60,30} \times 100$$

$$Y_{X/S} = 5\%$$

2.5.3.4. Numération de germes

On ne considère que les boîtes renfermant entre 30 à 300 colonies. Les résultats des cultures de la souche *Lactococcus lactis* sur milieu MRS Lactose agar figurent sur le tableau 15.

Tableau 15: Nombre de colonies issues de la culture sur milieu MRS Lactose solide

Temps	Dilutions	1	2
		1ère boîte (BP1)	2ème boîte (BP2)
T = 32 heures Inoculum : 0,1 mL de chaque dilution	0	H.G	H.G
	-1	H.G	H.G
	-2	H.G	< 803
	-3	119	137
	-4	12	16
	-5	-	1
	-6	-	-

H.G : hors gamme

Le nombre de colonie issu du produit pur pour BP1 et BP2 est supérieur à 300. Ces résultats ne sont pas exploitables. Il en est de même pour le produit dilué à 10^{-1} et 10^{-2} pour BP1 et BP2. Le produit dilué à 10^{-4} , 10^{-5} et à 10^{-6} pour BP1 et BP2 ne renferment que des colonies inférieures à 30, ces résultats sont non exploitables.

Ainsi, le milieu de production pur contient 128×10^4 UFC/mL.

2.5.3.5. Gamme étalon

Une corrélation entre les unités de D.O mesurées et la concentration en bactéries donnée en gramme de poids sec est établie par le spectrophotomètre UV-160 A à une longueur d'onde égale à 580 nm (absorption maximale).

En tenant compte des résultats (**ANNEXE XIII**), la valeur moyenne du poids sec de la biomasse pour une unité de D.O est égale à $0,72 \text{ g.L}^{-1}$.

Avec une corrélation entre la densité optique et la densité microbienne exprimée en poids sec par litre, on en déduit la concentration initiale de biomasse inconnue pour les autres solutions par extrapolation sur la courbe étalon.

CHAPITRE III : DISCUSSIONS

3.1. Aperçu sur les résultats obtenus

Très peu de travaux concernant la production de l'acide lactique en culture pure, non enrichie ont été développés. Il est important de relever que la quantité de lactate synthétisé par la souche *Lactococcus lactis* par rapport au substrat de départ dans notre étude est très faible.

Les résultats obtenus sur la souche *Lactococcus lactis* (52 mM) présentent un écart avec la théorie citée dans la littérature. En effet, **ROUKAS T. et al., 1998** ont obtenu une concentration plus élevée en acide lactique en culture pure avec *Lactococcus lactis* atteignant 116mM. [24]

La réduction de la quantité du lactate synthétisé outre l'effet inhibiteur du pH et de l'oxygène, peut être attribué à des carences en facteurs de croissance. En effet, le milieu de préculture utilisé (EPT) est un milieu de culture standard qui ne contient aucun élément spécifique pour le développement de *Lactococcus lactis*. Il en est de même pour le milieu de production « lactosérum déprotéiné ».

Au point de vue économique, la production du lactate présente un avantage de disposer une matière première bon marché et facilement disponible, soit 57 m³ de lactosérum exploitable par an au sein de la FROMAGERIE de BEVALALA. Elle offre, en outre, une solution à la menace environnementale que constitue le rejet du lactosérum dans le milieu extérieur.

Ainsi, les résultats obtenus sur l'optimisation la synthèse du lactate à partir du lactosérum ne sont pas complets. Pour une production appréciable, il faudrait insister sur les conditions expérimentales notamment sur le pH, sur l'oxygène avec des enrichissements en facteurs de croissance. Cependant, si le rendement en acide lactique n'a pas été satisfaisant, les résultats présentés permettent de fournir un ordre d'idée plus clair sur la fermentation lactique.

3.2. Volet environnement

L'adoption de la loi portant Charte de l'Environnement Malagasy (CEM) et la promulgation du décret relatif à la Mise en Compatibilité des Investissements avec l'Environnement (MECIE) implique une obligation pour les projets d'investissements publics ou privés susceptibles de porter atteinte à l'environnement d'être soumis à une Etude d'Impact Environnemental (EIE) ou à un programme d'Engagement Environnemental (PREE), selon la nature technique, l'ampleur de ces projet et la sensibilité de leurs milieux d'implantation.

Ainsi, le présent mémoire qui vise à produire du lactate à partir des sous-produits laitier dans une optique environnementale offre une solution alternative et intéressante à la valorisation du lactosérum et à la réduction de l'impact sur l'environnement engendré par le lactosérum.

D'abord, la voie de synthèse du lactate « voie biologique » permet d'obtenir un acide lactique optiquement défini dans notre cas l'acide L (+) lactique. En plus, la synthèse par voie biologique ne génère point des sous-produits qui peuvent souillées l'environnement contrairement à la synthèse chimique. Ensuite, la production d'acide lactique attire à l'heure actuelle une utilité intéressante : la synthèse des biopolymères biodégradables.

La valorisation des sous-produits laitiers « le lactosérum » en acide lactique, par voie biologique convient pour le respect de l'environnement. Cependant dans la réalité, le traitement devrait se faire à l'échelle industrielle et une étude plus approfondie tant au niveau de l'optimisation du traitement qu'au niveau de la réalisation sur terrain sont envisageables.

3.3. Aperçu sur l'Analyse de Cycle de Vie (ACV)

L'analyse de cycle de vie (ACV) est un outil utilisé pour évaluer l'impact environnemental potentiel d'un produit ou d'un processus tout au long de son cycle de vie en quantifiant l'utilisation des ressources (des "inputs" tels que l'énergie, les matières premières et l'eau) et les émissions environnementales (les "outputs" dans l'air, l'eau et le sol) associées au système évalué.

D'une façon simple, avec le processus décrit dans le présent mémoire, le lactosérum dans l'avenir suit le cycle de vie selon la figure 53.

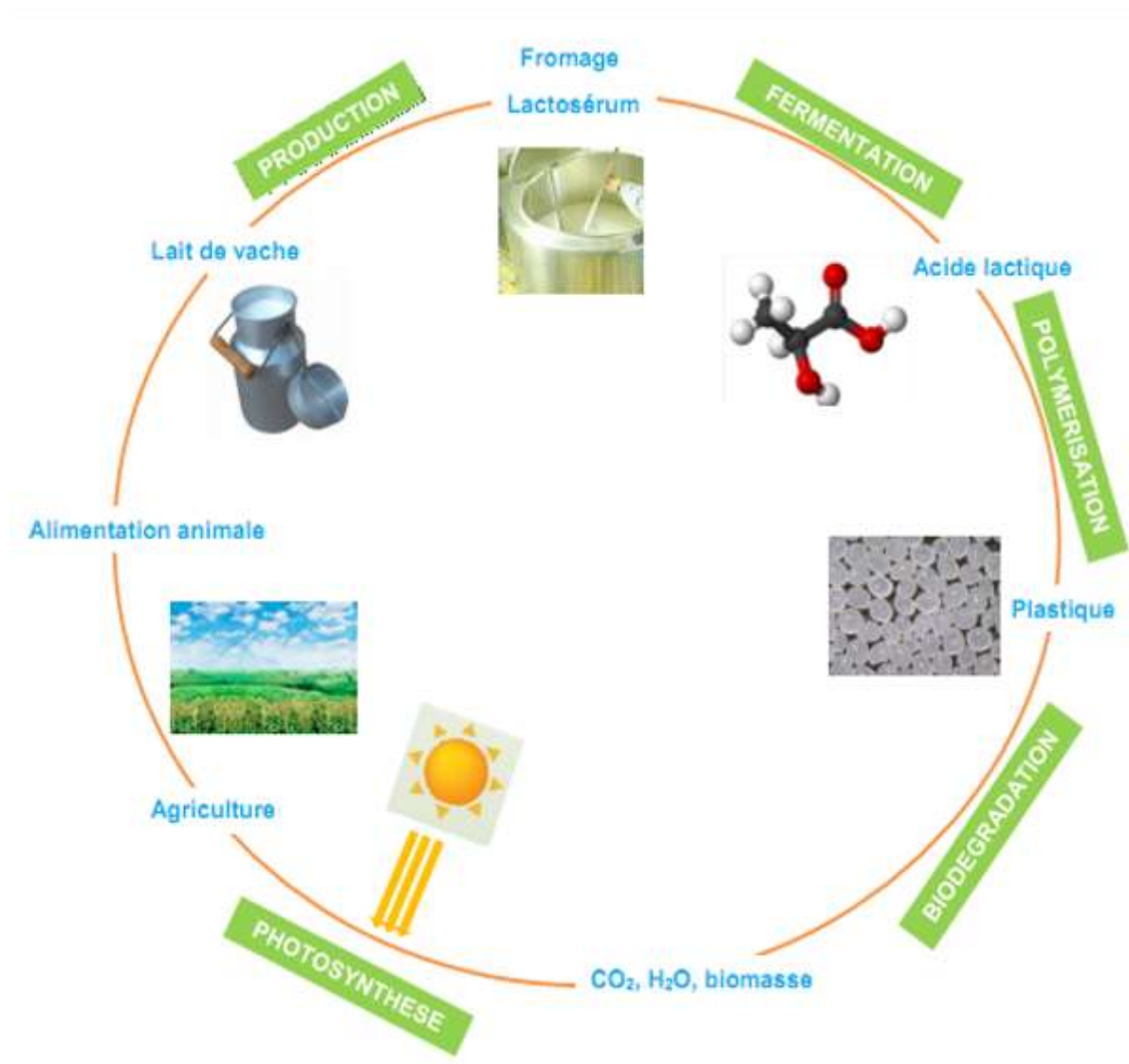


Figure 53 : Représentation simple du cycle de vie de lactosérum par fermentation lactique

En un mot, les impacts sur l'environnement liés au cycle de vie sont réduits et la matière première est renouvelable. Compte tenu de cet avantage, il serait judicieux d'étudier en détail le processus pour chaque étape.

CONCLUSION PARTIELLE

On peut conclure que le lactosérum doux est exploitable pour produire de l'acide lactique. Après optimisation des paramètres physico-chimiques, on constate que la fermentation est optimale à une concentration initiale en lactose de 7% et à une température égale à 30°C. L'agitation et la quantité initiale en inoculum n'ont pas d'effet positif sur la synthèse du lactate dans notre cas. Ainsi avec les paramètres optimisés, le lactosérum déprotéiné permet la synthèse de 52 mM de lactate à partir du lactosérum à pH non contrôlé. Cette valeur est fortement dépendante de la résistance de la souche étudiée ici *Lactococcus lactis*, vis-à-vis du milieu de culture et surtout vis-à-vis du pH. L'étude de la cinétique de croissance de *Lactococcus lactis* confirme que le taux de croissance maximale est de 1 h⁻¹. Quant au rendement de la consommation du substrat (5%), il est médiocre mais offre une solution alternative pour valoriser le lactosérum. Une étude plus approfondie avec d'autres paramètres pourrait améliorer le résultat.

**CONCLUSION
GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

Cette étude nous a permis de nous familiariser aux différentes techniques et analyses ainsi que les cultures et numérations de microorganismes.

Au terme de l'étude, le présent mémoire a permis d'exploiter le lactosérum doux, sous-produit de la FROMAGERIE de BEVALALA en milieu de culture bactérienne appelé : « Lactosérum déprotéiné stérile ». Après optimisation des paramètres physico-chimiques à pH non contrôlé où on a obtenu une concentration initiale en lactose de 7%, une température égale à 30°C, le lactosérum déprotéiné produit 52mM de lactate par le biais d'une souche homofermentaire appelé : *Lactococcus lactis*.

Cette valeur du lactate synthétisé présente un écart avec la théorie de telle sorte que les paramètres optimisés sont limités, seulement avec la concentration initiale en substrat et avec la température. L'écart pourrait être réduit si l'on optimise les autres paramètres qui influent la fermentation tels que le pH et la désoxygénation.

Au point de vue économique, la production du lactate présente l'avantage de disposer une matière première bon marché et facilement disponible, puisqu'il s'agit de résidu industriel. Elle offre, en outre, une solution à la menace environnementale que constitue le rejet du lactosérum dans le milieu extérieur.

Cependant, l'optimisation des autres paramètres (pH, O₂) mérite une étude plus approfondie.

Dans l'avenir, les prochaines étapes de l'étude devraient consister à approfondir les conditions expérimentales notamment le pH, l'oxygène et l'enrichissement du milieu de culture en facteurs de croissance comme l'extrait de levure. Il faut aussi travailler avec le milieu de culture plus spécifique (le milieu M17 pour *Lactococcus lactis*).

Dans ce sens, la méthode d'analyse utilisée devrait être plus spécifique de l'élément à doser (lactose, lactate) pour avoir plus de précision sur les résultats. Il en est de même pour la méthode de traitement du lactosérum car la thermoprécipitation présente des inconvénients sur la dégradation par brunissement non enzymatique du lactose (réaction de MAILLARD) et diminue ainsi la quantité du substrat disponible dans le milieu.

L'utilisation d'une autre souche plus résistant au pH acide et moins exigeant au point de vue nutritionnel comme *Lactobacillus casei* en culture mixte avec *Lactococcus lactis* pourrait améliorer le résultat pour une étude ultérieure. [25]

En perspective, l'étude devrait être conduite jusqu'à une échelle industrielle en travaillant avec un bioréacteur en système continu. Récemment, l'étude sur la fixation des bactéries lactiques avec un support (lit fixe) à grande échelle a été initiée selon **MEZIANE M.**, en 2008. **[26]**

En outre, la valorisation des éléments du lactosérum autre que le lactose, notamment les protéines pour enrichir les aliments infantiles, offre une voie intéressante et mérite d'être étudiée selon **ALAIS C. et al** en 1981. **[1]**

Il est aussi crucial d'étudier les techniques de purification efficaces et peu coûteuses pour récupérer l'acide lactique présent dans le milieu.

En bref, les conditions expérimentales, la méthode d'analyse, le choix de la souche étudiée pourraient améliorer le résultat.

REFERENCES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] : MINISTERE de l'ENVIRONNEMENT, des EAUX, des FORETS et du TOURISME Madagascar, UNITAR-IOMC, S.A.I.C.M., (2008) "Profil national sur la gestion rationnelle des produits chimiques" 146 pages.
- [2] : DOLLE J.B., (2003) "Mise au point du procédé de traitement des lactosérums et effluents de fromageries en production fermière" Compte rendu sur les techniques d'élevage et de qualité. Institut d'élevage INRA.
- [3] : HOFVENDAHL K., HAHN-HAGERDAL B., (2000) "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources" *Enzyme microbiology and technology*, **26** : 87-107.
- [4] : ALAIS C. et al., (1981) "Valorisation du lactosérum " *La technique laitière*, **952**, 7 – 101.
- [5] : ADEME, (1994) "Filière lait : sous-produits et déchets, Fiche n° 12 coproduits de la laiterie" Ed. *Ademe* 20 pages.
- [6] : LAPLANCHE J., (2004) "Expérimentation d'un traitement de lactosérum par biologie fixée" Projet de Plan Pichu.
- [7] : BREVET EUROPEEN (1998) "Procédé de purification d'acide lactique" Numéro de publication internationale: WO 1998/055442.
- [8] : ACHOUR M., (1994) "Contribution à l'étude du traitement d'effluents agro-industriels par extraction liquide-liquide. Mise au point d'un procédé continu séparation des acides tartrique et lactique" Thèse de Doctorat : Institut National Polytechnique de Toulouse.
- [9] : DATTA et al., (1995) "Technological and economic potential of polylactic acid and lactic acid derivatives" *Fems Microbiol Rev.* **B16B**, 221-231.
- [10] : WASEWAR K., YAWALKAR A., MOULIJN JA., PANGARKAR V., (2004) "Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction" *A Review Ind Eng Chem Res*; **43**: 5969-5982.
- [11] : METLEF S., DILMI-BOURAS A., (2009) "Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente" *Revue Nature et Technologie* n° 01 pages 33 à 44.
- [12] : LAURENT S., Federighi M., Jouve J. L., (1998) "Manuel de bactériologie alimentaire" polytechnic, Paris, 308p.

- [13] : LIN H. C., SU B. H., CHEN A. C., LIN T. W., TSAI C. H., YEH T. F. et OH W., (2005) "Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing *Enterocolitis* in very low birthweight infants" *Pediatrics*, 115: 1-4.
- [14] : NAIDU A. S., BIDLACK W.R., CLEMENS R.A., (1999) "Probiotic spectra of lactic acid bacteria" *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38** 13-126.
- [15] : DROUAULT S., CORTHIER G., (2001) "Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé" Unité d'écologie et de physiologie du système digestif, Institut National de la Recherche Agronomique INRA, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France, *Vet. Res.* **32** , , 101–117.
- [16] : RAHERIMANDIMBY M., GOURON P., DOMINGUEZ H., COCAIGN-BOUSQUET M., LINDLEY N.D., (2003) "Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*" *Journal of Biotechnology* 104, 77- 85.
- [17] : RAYNAUD S., (2006) "Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*" Thèse de Doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, Toulouse, n° d'ordre : **826**, pages : 309.
- [18] : THOMPSON J., GENTRY-WEEKS C.R. (1994) "Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques" Editeurs : De Roissart H., Luquet F.M. Vol. I, p 239-290.
- [19] : COCAIGN-BOUSQUET M., GARRIGUES C., LOUBIERE P., LINDLEY N.D., (1996) "Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*" *Antonie van Leeuw.* **70** : 253-267.
- [20] : CUQ J.L., (2007) "Université Montpellier II : Sciences et Techniques de microbiologies alimentaires" Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires.
- [21] : AMRANE A. and PRIGENT Y., (1999) "Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus* : growth and production coupling" *World journal of microbiology and biotechnology*, **14**: 529-534
- [22] : JUILLARD V., SPINLER H.E., DESMAZEAUD M.J et BOUQUIEN C.Y., (1987) "Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière" *Lait*, **67** : 149-172.

[23] : BEAL C., LOUVET P and CORRIE G., (1989) "Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398" *Applied of microbiology and biotechnology*, **32**: 148-154.

[24] : ROUKAS T., KOTZEKIDOU P. (1998) "Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture" *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 199 – 204.

[25] : AICHA D., (2007) "Production d'acide lactique par *Lactobacillus casei* *susp. rhamnosus* sur jus de datte : cinétique et optimisation en cultures discontinues, semi-continues et continues" Thèse de doctorat : L'institut National Polytechnique de Lorraine.

[26] : MEZIANE M., (2008) "Production en continu de l'acide lactique et du diacétyl par *Lactococcus lactis* *ssp* immobilisée sur pouzzolane dans un bioréacteur à lit fixe" Mémoire de DEA en Sciences Alimentaires à l'Université Hassiba Ben Bouali Chlef.

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

- <1> : <http://www.passeportsante.net/> (avril 2012)
- <2> : [http://www.dairyinfo.gc.ca/centre canadien d'information laitière](http://www.dairyinfo.gc.ca/centre%20canadien%20d'information%20laitiere) (mai 2012)
- <3> : <http://fr.wikipedia.org/> (avril 2012)
- <4> : <http://www.bacterio.cict.fr/> (mai 2012)
- <5> : <http://www.laurentbazinet.fsaa.ulaval.ca/> (mai 2012)
- <6> : <http://www.ademe.fr/> (avril 2012)
- <7> : <http://www.lactic.com/> (avril 2012)
- <8> : <http://www.chimix.com/> (mai 2012)
- <9> : www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/m/cours3VMB/TP/milieux.doc (mai 2012)
- <10> : <http://www.caducee.net/> (avril 2012)
- <11> : www.cniel.com/publicat/Questions_sur/pdf/QS_30.pdf (mai 2012)
- <12> : <http://www.ebi.ac.uk/> (mai 2012)
- <13> : <http://www.arnobio2.com/> (avril 2012)
- <14> : <http://lyc-chevreuse-gif.ac-versailles.fr/> (mai 2012)
- <15> : <http://www.bacteriologie.net/> (avril 2012)

ANNEXES

ANNEXE I : NORMES EN VIGUEUR DE REJETS D'EFFLUENTS AQUEUX (MINISTÈRE de l'ENVIRONNEMENT et al., 2008).

Facteurs organoleptiques

Paramètres	Unité	Normes
pH		6,0 - 9,0
Conductivité	µs/cm	200
Matières en suspension	mg/l	60
Température	°C	30
Couleur	échelle Pt/Co	20
Turbidité	NTU	25

Facteurs biologiques

Paramètres	Unité	Normes
Demande chimique en oxygène (DCO)	mg/l	150
Demande biochimique en oxygène (DBO5)	mg/l	50

Facteurs chimiques

Paramètres	Unité	Normes
Dureté totale comme CaCO ₃	mg/l	180,0
Azote ammoniacal	mg/l	15,0
Nitrates	mg/l	20,0
Nitrites	mg/l	0,2
NTK (azote total Kjeldahl)	mg/l-N	20,0
Phosphates comme PO ₄ ³⁻	mg/l	10,0
Sulfates comme SO ₄ ²⁻	mg/l	250
Sulfures comme S ²⁻	mg/l	1,0
Huiles et graisses	mg/l	10,0
Phénols et crésols	mg/l	1,0
Hydrocarbures (HAP)	mg/l	1,0
Agents de surface (ioniques ou non)	mg/l	20
Chlore libre	mg/l	1,0
Chlorures	mg/l	250

ANNEXE II : Localisation de la FROMAGERIE DE BEVALALA



FROMAGERIE DE BEVALALA

ANNEXE III : LISTE DES APPAREILS ET REACTIFS

MATERIELS

- ❖ Agitateur magnétique
- ❖ Autoclave
- ❖ Balance de précision SARTORIUS
- ❖ Compteur de colonie
- ❖ Coton cardé
- ❖ Dessiccateur
- ❖ Etuve memmert
- ❖ Microscope optique
- ❖ Papier filtre
- ❖ Papier pH
- ❖ Plaque chauffante
- ❖ Propipette
- ❖ Spectrophotomètre UV visible UV-160A
- ❖ Filtre
- ❖ Thermomètre
- ❖ Vortex

VERRERIES

- ❖ Boîte de Pétri
- ❖ Burette
- ❖ Erlenmeyer 250 mL

SOLUTIONS ET REACTIFS

- ❖ Cristal violet
- ❖ Eau distillée stérile
- ❖ Liqueur de Fehling :

<u>Solution A:</u>	CuSO ₄ , 5H ₂ O 40 g
	Eau 300 mL
<u>Solution B:</u>	NaOH 130 g
	Tartrate de K et Na 160 g
	Eau 700 mL
- ❖ Lugol (solution d'iode iodo-iodurée)
- ❖ Mélange alcool-acétone
- ❖ Phénolphtaléine
- ❖ Pipette stérile à usage unique
- ❖ Réactifs & Solutions
- ❖ Solution de Glucose 5‰
- ❖ Safranine
- ❖ Soude
- ❖ Tube à essai stérile

ANNEXE IV : MILIEU MRS

HISTORIQUE

En 1960, de Man, Rogosa et Sharpe ont développé la formulation d'un milieu spécialement adapté aux cultures des lactobacilles provenant de produits laitiers.

PRINCIPE

La peptone, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles. Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne. Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

FORMULE

La composition du milieu MRS Lactose agar en g/L est la suivante :

❖ Protéose peptone	10
❖ Extrait de viande	10
❖ Extrait de levure	5
❖ Dextrose	20
❖ Tween 80	1
❖ Citrate d'ammonium	2
❖ Acétate de sodium	5
❖ Sulfate de magnésium	0,1
❖ Sulfate de manganèse	0,05
❖ Phosphate dipotassique	2
❖ Lactose monohydraté	5
❖ Agar agar	15

Le pH final après autoclavage est $6,5 \pm 0,2$.

ANNEXE V : EPT

La composition de l'Eau Péptonée Tamponée en g/L est la suivante :

❖	Peptone de caséïne	10
❖	Chlorure de sodium	5
❖	Hydrogénophosphate de disodium dodécahydraté	9
❖	Dihydrogénophosphate de potassium	1,5
❖	Eau	qsp 1L

Le pH final après autoclavage à 121°C pendant 15 minutes est $7 \pm 0,20$.

ANNEXE VI : CHOOZIT MA 400-1

PRODUCT DESCRIPTION - PD 206693-6.0FR

No. de produit 50431

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 5 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Description

Ferment lactique lyophilisé concentré pour l'ensemencement direct du lait et des bases lactées.

Dosages d'utilisation

Produit	Dose
fromage à pâte molle	5 - 10 DCU / 100 l de lait
Fromage à pâte demi-dure	5 - 10 DCU / 100 l de lait
type quark	2.5 - 5 DCU / 100 l de lait
crème acide	2.5 - 5 DCU / 100 l de lait

Les doses d'ensemencement préconisées sont données à titre indicatif. Des ferments auxiliaires peuvent être ajoutés en fonction de la technologie, du taux de matières grasses et des caractéristiques produits recherchés.

Notre responsabilité ne serait être engagée dans le cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Conseils d'utilisation

Conserver à une température < 4°C dans un endroit sec. Lorsque le produit est conservé à une température négative, laisser le sachet pendant 30 à 60 minutes, à température ambiante, avant de l'ouvrir. Dans le cas contraire, les propriétés de la culture en seront affectées. Prolonger l'exposition à température ambiante diminuera également les performances.

Vérifier avant utilisation que la culture utilisée est sous forme de poudre. Ajouter directement au lait de fabrication dès que les pâles d'agitation de la cuve sont recouvertes de lait. Eviter la formation de mousse et d'air dans le lait.

Recommandations importantes :

Si le produit forme une masse compacte, il doit être mis au rebut. Afin de garder la contamination bactériologique sous contrôle, s'assurer que l'environnement et les équipements soient nettoyés avec des produits appropriés, à intervalles réguliers. Supprimer tout système qui pourrait recycler une partie du produit fini au début de la chaîne de fabrication afin de limiter la propagation phagique. Notre responsabilité ne serait être engagée en cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Composition

Lactococcus lactis subsp. lactis
Lactococcus lactis subsp. cremoris
Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis
Streptococcus thermophilus
Support:
Saccharose
Maltodextrines

Propriétés

- Ferments hétérofermentaires pour mélanges fermiers, essentiellement mésophiles.
- Ensemencement direct

Une rotation phagique est disponible sur demande.

Spécifications physiques/chimiques

Normes d'activité acidifiante

Milieu test :
Lait stérilisé reconstitué (10% matières sèches)
Chauffé 20 min à 110°C. Standardisé à un pH 6,60

Température :	30 °C
Taux d'ensemencement :	6.25 DCU / 100 l
Delta pH :	0.9
Temps pour atteindre le delta pH :	<= 6 heures

Spécifications microbiologiques

Normes bactériologiques (données standard et méthodes de référence)

Coliformes	< 10 / g [1]
Enterococci	< 20 / g [2]
Levures	< 10 / g [3]
Moisissures	< 10 / g [3]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [4]
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g [5]
Salmonella	neg. / 25 g [6]

[1] NF V08-015, IDF 73A-1985

[2] Gélose bile esculine azide de sodium / 48 h à 37 °C

[3] NF V08-022, IDF 84B-1991

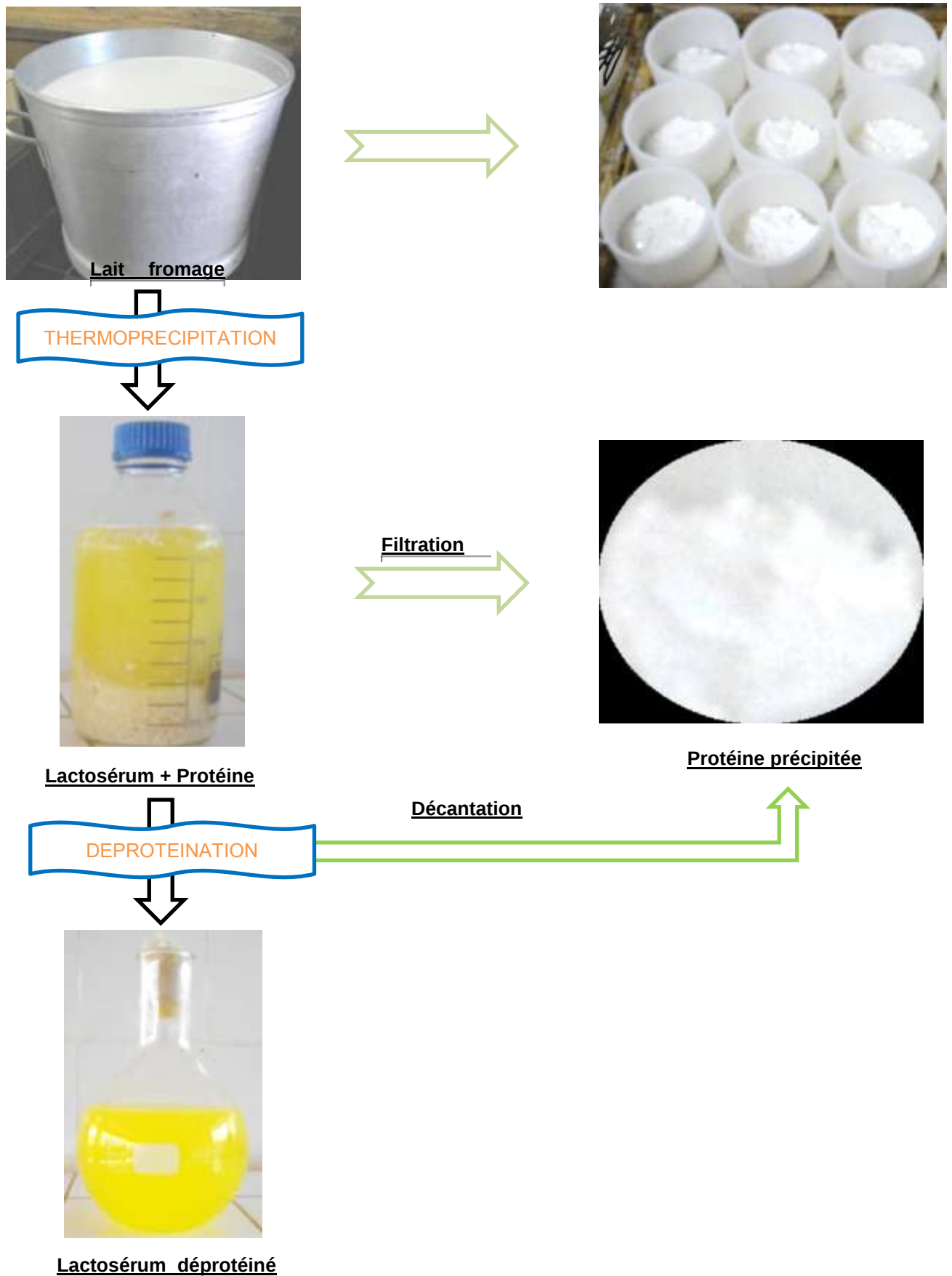
[4] NF V08-057, IDF 145A-1997

[5] NF V08-055, IDF 143A-1990

[6] NF V08-052, IDF 93B-1995

Les informations contenues dans cette publication sont fondées sur nos travaux de recherche et développement et sont, dans l'état actuel de nos connaissances, fiables. Toutefois, les utilisateurs doivent effectuer leurs propres essais afin de déterminer si nos produits sont adaptés à leurs besoins spécifiques et de définir le statut juridique de l'usage qu'ils prévoient de faire de ces produits. Les déclarations contenues dans ce document ne constituent en aucune manière une garantie expresse ou implicite et la société n'assume aucune responsabilité concernant la contrefaçon éventuelle de brevets.

ANNEXE VII : PRETRAITEMENT DU LACTOSERUM



ANNEXE VIII : COLORATION GRAM

Elle nécessite un frottis fixé en effectuant une fixation simple à l'eau et à la flamme. Ensuite, la lame est posée sur un bac de coloration en passant par les différentes étapes suivantes :

- ❖ Coloration par le cristal violet (30 secondes à 1 minute) suivi d'un rinçage à l'eau déminéralisée.
- ❖ Fixation du colorant par le lugol (20 secondes) suivi d'un rinçage à l'eau déminéralisée.
- ❖ Décoloration rapide à l'alcool + acétone sur la lame inclinée obliquement suivie d'un rinçage à l'eau déminéralisée.
- ❖ Recoloration à la safranine ou à la fuchsine (30 secondes à 1 minute) suivit d'un lavage à l'eau déminéralisée.

A la fin, on sèche la lame sur une platine chauffante à 40°C puis on procède à l'observation sous microscope.

ANNEXE IX : Conservation de la souche



***Lactococcus lactis* sur milieu MRS Lactose incliné en tube à essai**

ANNEXE X : DOSAGE DU LACTOSE PAR LA METHODE DE FEHLING

Le dosage du lactose se fait par une méthode de comparaison. Un même volume de liqueur de Fehling est dosé successivement, dans les mêmes conditions, par une solution de concentration connue C_0 en glucose et par le lactosérum de concentration C_1 inconnue en lactose (sucre réducteur).

- ❖ soit n_0 , le nombre de molécules de glucose utilisées pour transformer les ions Cu^{2+} en ions Cu^+ pour le dosage de la solution témoin.
- ❖ soit n_1 , le nombre de molécules de lactose utilisées pour transformer les ions Cu^{2+} en ions Cu^+ pour le dosage de la solution test.

Le nombre de molécules du lactose ou glucose utilisé pour transformer les ions Cu^{2+} en ions Cu^+ pour le dosage témoin et le dosage test est identique.

donc $n_0 = n_1$ et $C_0.V_0 = C_1.V_1$

C_1 : concentration en lactose

C_0 : concentration en glucose

 Calcul de la quantité de glucose réduisant 5 mL de LF

Il faut verser un volume de solution de glucose V_1 à 5 g/L = 5mL pour réduire 5 mL de LF c'est-à-dire :

5 mL du LF réduit 5mL de solution de glucose 5‰

Donc, 100 mL de solution glucosé 5‰ contient 0.5g de glucose

5 mL de la solution contient 2.50×10^{-2} g de glucose

 Calcul du nombre de mole de sucre réducteur (SR) réduisant 5 ml de LF

180 g de glucose est contenu dans la solution molaire de glucose 1M

Alors 2.50×10^{-2} g de glucose contient 1.38×10^{-4} M de glucose

Soit 1.38×10^{-4} M de SR

 Calcul de la concentration en lactose du filtrat à doser

Le volume du filtrat V_F pour réduire 5 mL de LF contient donc 1.38×10^{-4} M de SR

Dans un volume de 1 000 mL, le filtrat contient $C_{\text{lact}}(\text{M}) = 1\,000 \times (1.38 \times 10^{-4})/V_F$

$$C_{\text{lact}}(\text{M}) = 1.38 \times 10^{-1} / V_F$$

or $M(\text{lactose}) = 342$ g

D'où $C_{\text{lact}}(\text{g/L}) = C_{\text{lact}}(\text{M}) \times M(\text{lactose}) = (1.38 \times 10^{-1}) \times 342$

La teneur en lactose de l'échantillon à doser est calculée par la formule suivante :

$[\text{Lactose}] = \frac{4,72}{V_F} (\%)$
--

**ANNEXE XI :
CALCUL DU NOMBRE DE MOLE D'ACIDE LACTIQUE**

A l'équivalence, on a :

$$C_a \cdot V_a = C_b \cdot V_b$$

$$C_a \text{ (N)} = C_b \cdot V_b / V_a \text{ or } V_a \text{ est fixé à 10 mL et } C_b \text{ à 0,1N}$$

$$C_a \text{ (N)} = 0,01 \times V_b$$

Une solution normale de lactate 1N correspond à 1M = 1000mM

Avec une solution ayant C_a (N) on a :

$$C_a \text{ (mM)} = 10 \times V_b$$

La formule suivante permet de calculer la quantité du lactate synthétisé en millimole (mM).

$C_a \text{ (mM)} = 10 \times V_b$

où

- ❖ C_a (mM) est le nombre de mole en mM de lactate
- ❖ C_b est la concentration d'hydroxyde de sodium : $C_b = 0.1 \text{ N}$
- ❖ V_b le volume équivalent, en mL, d'hydroxyde de sodium
- ❖ V_a est le volume du lactosérum déprotéiné : $V_a = 10 \text{ mL}$

ANNEXE XII : RESULTATS NUMERIQUES SUR L'OPTIMISATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES D'INCUBATIONS

12.1. Influence de la concentration initiale en lactose ([S₀] en%)

Tableau I : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [S₀] = 0,5%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	2	5	0,066
2	4		0,140
4	6		0,285
6	8		0,315
8	13		0,345
10	14		0,363
12	14		0,381
14	14		0,395
16	14		0,410
18	14		0,442
20	14		0,475
22	14		0,522
24	14		0,570
26	14		0,603
28	14		0,637
30	14		0,668
32	14	4,210	0,700

Tableau II : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [S₀] = 1%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	2	10	0,126
2	3,500		0,149
4	8,500		0,303
6	13,50		0,355
8	14,500		0,408
10	15,50		0,453
12	17		0,499
14	17		0,557
16	17		0,615
18	17		0,624
20	17		0,634
22	17		0,639
24	17		0,645
26	17		0,649
28	17		0,650
30	17		0,655
32	17	6,28	0,657

Tableau III : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 2%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	3,5	20	0,129
2	4,5		0,146
4	8,5		0,306
6	16		0,394
8	20		0,482
10	21,25		0,506
12	22,50		0,531
14	22,50		0,532
16	22,50		0,534
18	22,50		0,556
20	22,50		0,579
22	22,50		0,608
24	22,50		0,637
26	22,50		0,653
28	22,50		0,669
30	22,50		0,687
32	22,50	15,8	0,706

Tableau IV : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 3%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	4,74	30	0,126
2	4,74		0,136
4	9,5		0,46
6	17		0,467
8	21,5		0,474
10	24		0,480
12	25,5		0,487
14	27		0,489
16	28		0,492
18	28		0,5
20	28		0,54
22	28		0,572
24	28		0,637
26	28		0,674
28	28		0,712
30	28		0,737
32	28	24	0,763

Tableau V : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 4%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	6	40	0,119
2	6,44		0,127
4	10		0,282
6	18		0,366
8	23		0,45
10	24		0,458
12	28		0,466
14	29		0,487
16	30		0,508
18	30		0,537
20	30		0,566
22	30		0,610
24	30		0,655
26	30		0,673
28	30		0,691
30	30		0,707
32	30	34,83	0,723

Tableau VI : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 5%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	8	50	0,082
2	8		0,119
4	14		0,286
6	22		0,359
8	25		0,433
10	28		0,436
12	32		0,439
14	33		0,455
16	33		0,471
18	33		0,495
20	33		0,519
22	33		0,561
24	33		0,603
26	33		0,637
28	33		0,672
30	33		0,688
32	33	43,06	0,705

Tableau VII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 6%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	10,77	60	0,066
2	10,77		0,095
4	16		0,24
6	25		0,342
8	28		0,444
10	32		0,447
12	35		0,451
14	36		0,463
16	38		0,475
18	38		0,494
20	38		0,514
22	38		0,554
24	38		0,594
26	38		0,638
28	38		0,683
30	38		0,704
32	38	53,5	0,725

Tableau VIII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 7%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	12	70	0,068
2	12		0,104
4	18		0,245
6	30		0,337
8	34		0,429
10	36		0,443
12	40		0,458
14	41		0,485
16	42		0,513
18	42		0,524
20	42		0,536
22	42		0,541
24	42		0,547
26	42		0,594
28	42		0,641
30	42		0,664
32	42	60	0,687

Tableau IX : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 8%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	14	80	0,061
2	14		0,092
4	20		0,276
6	30		0,345
8	33		0,414
10	36		0,425
12	40		0,437
14	40		0,453
16	42		0,47
18	42		0,487
20	42		0,504
22	42		0,535
24	42		0,566
26	42		0,602
28	42		0,639
30	42		0,641
32	42	67,74	0,644

Tableau X : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec [So] = 9%

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	16	90	0,057
2	16		0,108
4	18		0,143
6	30		0,221
8	33		0,299
10	36		0,362
12	40		0,426
14	42		0,453
16	42		0,480
18	42		0,487
20	42		0,495
22	42		0,503
24	42		0,511
26	42		0,514
28	42		0,518
30	42		0,534
32	42	79	0,550

12.2. Influence de l'agitation

Tableau XI : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 0 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	12	70	0,068
2	12		0,104
4	18		0,245
6	30		0,337
8	34		0,429
10	36		0,443
12	40		0,458
14	41		0,485
16	42		0,513
18	42		0,524
20	42		0,536
22	42		0,541
24	42		0,547
26	42		0,594
28	42		0,641
30	42		0,664
32	42	60	0,687

Tableau XII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation à 10 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	10	70	0,073
2	12		0,134
4	17,77		0,190
6	24,44		0,275
8	31,11		0,359
10	33,33		0,365
12	36		0,372
14	38		0,423
16	40		0,475
18	40		0,490
20	40		0,506
22	40		0,520
24	40		0,535
26	40		0,544
28	40		0,552
30	40		0,600
32	40	60	0,650

Tableau XIII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation &= 15 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	10	70	0,091
2	12		0,151
4	18		0,270
6	23		0,320
8	29		0,370
10	30		0,379
12	33		0,386
14	34		0,394
16	35		0,403
18	35		0,419
20	35		0,486
22	35		0,510
24	35		0,535
26	35		0,597
28	35		0,660
30	35		0,708
32	35	58	0,756

Tableau XIV : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation &= 20 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	10	70	0,021
2	10		0,144
4	16		0,250
6	23		0,295
8	25		0,340
10	28		0,374
12	29		0,410
14	29,77		0,427
16	31		0,446
18	31		0,478
20	31		0,509
22	31		0,562
24	31		0,614
26	31		0,660
28	31		0,706
30	31		0,741
32	31	59,6	0,776

Tableau XV : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation $\approx$ 25 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	7	70	0,086
2	10		0,134
4	14		0,186
6	22		0,242
8	26		0,298
10	30		0,316
12	30		0,335
14	30		0,353
16	30		0,372
18	30		0,390
20	30		0,409
22	30		0,427
24	30		0,446
26	30		0,494
28	30		0,563
30	30		0,585
32	30	60	0,628

Tableau XVI : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation $\approx$ 50 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	7	70	0,086
2	9		0,173
4	13		0,252
6	15		0,300
8	20		0,337
10	26		0,372
12	26		0,422
14	26		0,490
16	26		0,557
18	26		0,600
20	26		0,642
22	26		0,684
24	26		0,727
26	26		0,767
28	26		0,808
30	26		0,866
32	26	59	0,925

Tableau XVII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation &= 75 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	10	70	0,086
2	10		0,104
4	14		0,172
6	16		0,215
8	16,53		0,258
10	17		0,275
12	18		0,291
14	18		0,385
16	18		0,480
18	18		0,558
20	18		0,637
22	18		0,716
24	18		0,794
26	18		0,822
28	18		0,850
30	18		0,887
32	18	58,7	0,926

Tableau XVIII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction du temps avec agitation &= 100 rpm

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	4	70	0,086
2	7		0,093
4	8		0,100
6	10		0,131
8	14		0,162
10	16		0,252
12	16		0,343
14	16		0,414
16	16		0,486
18	16		0,519
20	16		0,553
22	16		0,612
24	16		0,673
26	16		0,735
28	16		0,767
30	16		0,798
32	16	58,7	0,860

12.3. Influence de la température

Tableau XIX : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 25°C

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	5	70	0,032
2	7		0,056
4	8		0,080
6	11,5		0,162
8	15		0,244
10	22		0,271
12	36		0,326
14	40		0,354
16	42		0,381
18	42		0,408
20	42		0,435
22	42		0,462
24	42		0,465
26	42		0,467
28	42		0,470
30	42		0,480
32	42	61,34	0,491

Tableau XX : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 30°C

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	5	70	0,032
2	7		0,071
4	9		0,112
6	13		0,226
8	24		0,341
10	30		0,357
12	42		0,373
14	44		0,390
16	47		0,407
18	48		0,423
20	50		0,439
22	52		0,456
24	52		0,473
26	52		0,485
28	52		0,498
30	52		0,511
32	52	61,33	0,525

Tableau XXI : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t = 37°C

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	12	70	0,068
2	12		0,104
4	18		0,245
6	30		0,337
8	34		0,429
10	36		0,443
12	40		0,458
14	41		0,485
16	42		0,513
18	42		0,524
20	42		0,536
22	42		0,541
24	42		0,547
26	42		0,594
28	42		0,641
30	42		0,664
32	42	60	0,687

Tableau XXII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =42°C

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	5	70	0,032
2	7		0,090
4	12		0,148
6	20		0,156
8	26		0,164
10	28		0,172
12	29		0,180
14	30		0,181
16	31		0,182
18	31		0,199
20	31		0,216
22	31		0,217
24	31		0,219
26	31		0,224
28	31		0,230
30	31		0,245
32	31	67	0,260

Tableau XXIII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction de la température t =45°C

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	5	70	0,032
2	7		0,039
4	12		0,077
6	13		0,097
8	14		0,118
10	15		0,124
12	17		0,130
14	18		0,131
16	18		0,133
18	18		0,142
20	18		0,151
22	18		0,178
24	18		0,206
26	18		0,214
28	18		0,222
30	18		0,230
32	18	68,45	0,238

12.4. Influence de la quantité de l'inoculum

Tableau XXIV : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (10%)

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	5	70	0,032
2	7		0,071
4	9		0,112
6	13		0,226
8	24		0,341
10	30		0,357
12	42		0,373
14	44		0,390
16	47		0,407
18	48		0,423
20	50		0,439
22	52		0,456
24	52		0,473
26	52		0,485
28	52		0,498
30	52		0,511
32	52	61,33	0,525

Tableau XXV : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (7,5%)

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	7	70	0,011
2	7		0,092
4	8		0,282
6	11		0,316
8	17		0,350
10	27		0,384
12	32		0,419
14	39		0,442
16	43		0,466
18	44		0,476
20	46		0,487
22	48		0,509
24	49		0,532
26	52		0,552
28	52		0,573
30	52		0,591
32	52	60,8	0,609

Tableau XXVI : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (5%)

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	6	70	0,008
2	6		0,067
4	7		0,162
6	9		0,220
8	12		0,279
10	18		0,337
12	25		0,396
14	32		0,424
16	37		0,452
18	40		0,477
20	42		0,502
22	44,5		0,503
24	47		0,505
26	49		0,529
28	52		0,554
30	52		0,575
32	52	60,55	0,596

Tableau XXVII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité en inoculum (3,5%)

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	4	70	0,005
2	4		0,046
4	6		0,114
6	8		0,182
8	10		0,250
10	14		0,318
12	22		0,387
14	30		0,413
16	35		0,440
18	40		0,455
20	41		0,470
22	43,5		0,478
24	46		0,486
26	48		0,514
28	50		0,542
30	52		0,565
32	52	60,5	0,588

-

Tableau XXVIII : Evolution du lactate, biomasse, lactose en fonction la quantité d'inoculum (1%)

Temps (h)	Lactate en mM	Lactose g/L	Biomasse g/L
0	3	70	0,004
2	4		0,026
4	6		0,102
6	6		0,120
8	9		0,156
10	12		0,200
12	14		0,252
14	16		0,298
16	28		0,344
18	32		0,364
20	35		0,384
22	40		0,414
24	45		0,445
26	47		0,461
28	49		0,477
30	51		0,483
32	52	60,3	0,490

ANNEXE XIII : Gamme étalon**Corrélation entre la densité optique et la densité microbienne**

Le tableau et la figure suivante représentent les résultats obtenus.

Courbe d'étalonnage montrant l'évolution de la D.O en fonction de la biomasse (poids secs)

Solution étalon	Poids secs de la biomasse (g.L ⁻¹)	D.O à 580 nm
Etalon 0	0	0
Etalon 1	0,2	0,275
Etalon 2	0,4	0,55
Etalon 3	0,6	0,835
Etalon 4	0,8	1,131
Etalon 5	1,0	1,38

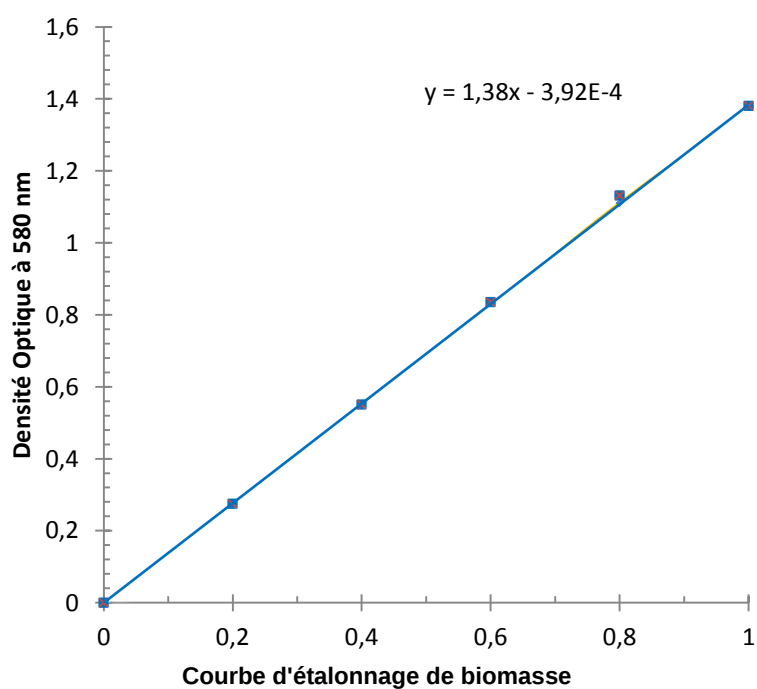


TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Glossaire	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Introduction.....	1
PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Généralités sur le lactosérum	3
1.1. Définition.....	3
1.1.1. Lactosérum.....	3
1.2. Classification	3
1.2.1. Le lactosérum acide.....	3
1.2.2 Le lactosérum doux	3
1.3. Composition chimique	3
1.3.1. Caractéristiques des protéines du lactosérum.....	5
1.3.2. Caractéristiques du glucide du lactosérum	5
1.3.3. Caractéristiques des lipides du lactosérum	6
1.3.4. Caractéristiques des germes du lactosérum	6
1.4 Valorisation.....	8
1.4.1 Utilisation à l'état natif.....	8
1.4.2 Utilisation des protéines du lactosérum.	8
1.4.3. Utilisation du lactose.....	8
1.4.4. Utilisation des lipides du lactosérum.....	9
1.5. Aspect réglementaire.....	9
Chapitre II : Généralités sur l'acide lactique	10
2.1. Historique	11
2.2. Définition.....	11
2.3. Classification	11
2.3.1. Propriétés chimiques	12
2.3.2. Propriétés physiques	12
2.4. Domaines d'utilisations	13
2.4.1 Alimentaire	13
2.4.2. Cosmétique	13
2.4.3. Pharmaceutique.....	13
2.4.4. Industriel	13
2.5. Différentes technologies de production d'acide lactique	14
2.5.1 Synthèse par voie chimique.....	14
2.4.2. Synthèse par voie fermentaire	14
2.6. Production d'acide lactique	16
Chapitre III : Généralités sur les bactéries lactiques.....	16
3.1. Aperçu sur la taxonomie	16

3.2. Définition.....	16
3.3. Particularités.....	17
3.4. Milieu de culture	17
3.4.1. Les milieux non sélectifs	17
3.4.2. Les milieux non sélectifs enrichis.....	17
3.4.3. Les milieux sélectifs	18
3.5. Utilisations des bactéries lactiques.....	18
3.6. <i>Lactococcus lactis</i>	18
3.6.1 Caractéristiques.....	18
3.6.2. Classification	19
3.6.3. Transport du lactose chez <i>Lactococcus lactis</i>	19
3.6.4. Métabolisme du lactose chez <i>Lactococcus lactis</i>	21
Chapitre IV : Généralités sur la fermentation lactique	23
4.1. Définition.....	23
4.2. Différents types de fermentation.....	23
4.2.1. Fermentation alcoolique	23
4.2.2. Fermentation lactique	23
4.3. Production d'acide lactique	24
4.3.1. Culture discontinue	24
4.3.2. Paramètres influençant la croissance	24
4.3.2.1. Température	24
4.3.2.2. pH	25
4.3.2.3. Concentration en substrat.....	26
4.3.2.4. Concentration en inoculum	26
4.3.2.5. Effet de l'agitation	26
4.3.2.6. Besoins en facteurs de croissance	27
4.3.2.7. Facteurs d'inhibition	27
4.3.3. Cinétique de croissance	27
4.3.3.1. La phase de latence	28
4.3.3.2. La phase d'accélération	28
4.3.3.3. La phase exponentielle	28
4.3.3.4. La phase de ralentissement.....	28
4.3.3.5. La phase stationnaire	30
4.3.3.6. La phase de déclin.....	30
Conclusion partielle	31
PARTIE II : PARTIE EXPERIMENTALE	
Chapitre I : Matériels et méthodes.....	32
1.1. Matériels.....	32
1.1.1. Appareils et réactifs	32
1.1.2. Milieu de production.....	32
1.1.3. Milieu de culture pour les bactéries lactiques	32
1.1.4. Milieu de préculture	32
1.1.5. Matériel biologique.....	32
1.2. Méthodes.....	33

1.2.1. Prétraitement du lactosérum.....	33
1.2.2. Stérilisation	33
1.2.3. Bactéries lactiques.....	34
1.2.3.1. Activation des bactéries lactiques	34
1.2.3.2. Isolement - Identification de <i>Lactococcus lactis</i>	34
1.2.3.3. Conservation de la souche étudiée.....	36
1.2.4. Optimisation des paramètres physico-chimiques	36
2.2.4.1. Milieu de préculture	36
2.2.4.2. Conduite de la culture	36
1.2.5. Production d'acide lactique	37
1.2.6. Méthodes d'analyses	37
1.2.6.1. Biomasse	37
1.2.6.2. Lactose	40
1.2.6.3. Acide lactique.	41
Chapitre II : Résultats et interprétations	43
2.1. Production du lactosérum à la fromagerie de Bevalala	43
2.2. Traitement du petit lait en milieu de culture	43
2.3. Bactéries lactiques	44
2.3.1. Activation des bactéries en état latent	44
2.3.2. Isolement	45
2.3.3. Identification	46
2.4. Optimisation des paramètres physico-chimiques	48
2.4.1. Influence de la concentration initiale en lactose	48
2.4.2. Influence de l'agitation	52
2.4.3. Influence de la température	56
2.4.4. Influence de la quantité en inoculum	59
2.5. Production d'acide lactique	62
2.5.1. Etude de la cinétique de croissance de <i>Lactococcus lactis</i>	62
2.5.2. Délimitation des phases.....	64
2.5.3. Calcul des paramètres de croissance.....	65
2.5.3.1. La vitesse spécifique de croissance	65
2.5.3.2. Le temps de génération	65
2.5.3.3. Le rendement de biomasse par rapport au substrat	66
2.5.3.4. Numération de germes	66
2.5.3.5 Gamme étalon	67
Chapitre III : Discussions	68
3.1. Aperçu sur les résultats obtenus	68
3.2. Volet environnement.....	69
3.3. Aperçu sur l'analyse de cycle de vie.....	70
Conclusion partielle	71
Conclusion générale et Perspectives	72

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES WEBOGRAPHIQUES

ANNEXES

ANNEXE I : Normes en vigueur de rejets d'effluents aqueux

ANNEXE II : Localisation de la Fromagerie de Bevalala

ANNEXE III : Liste des appareils et réactifs

ANNEXE IV : Milieu MRS

ANNEXE V : EPT

ANNEXE VI : Choozit MA 400-1

ANNEXE VII : Prétraitement du lactosérum

ANNEXE VIII : Coloration gram

ANNEXE IX : Conservation de la souche

ANNEXE X : Dosage du lactose par la méthode de Fehling

ANNEXE XI : Calcul du nombre de mole d'acide lactique

ANNEXE XII : Résultats numériques sur l'optimisation des paramètres physico-chimiques d'incubations

ANNEXE XIII : Gamme étalon

Auteur : RAKOTOMALALA Andrianambinintsoa Denis

Titre : "Contribution à l'optimisation des paramètres de production d'acide lactique par *Lactococcus lactis* à partir d'un sous-produit laitier : cas du lactosérum".

Nombre de pages : 72

Nombre de figures : 53

Nombre de tableaux : 15

RESUME :

Le secteur laitier génère d'importantes quantités de déchets souvent non valorisées. Parmi eux figure le lactosérum qui est un milieu complexe contenant essentiellement du lactose et des protéines. La "Fromagerie de Bevalala" en produit 57 m³ par an. Or le lactosérum contient environ 50 g/l de matière organique (DBO) facilement biodégradable à l'origine d'un bouleversement écologique. Pour remédier à ce problème, de nombreux procédés sont envisageables. Parmi ceux-ci, on distingue la production d'acide lactique par voie biologique. Ainsi ce travail de recherche a porté sur la production d'acide lactique à partir du lactosérum par le biais de *Lactococcus lactis*, une bactérie lactique homofermentaire capable de produire l'acide L (+) lactique. L'acide lactique est largement utilisé dans les domaines : cosmétique, médicinal, alimentaire et surtout environnemental. La première partie de cette étude est consacrée à l'optimisation des paramètres de production du lactate à pH non contrôlé où on a obtenu une concentration initiale en lactose de 7%, une température égale à 30°C optimale pour la production. Dans un deuxième temps, la production d'acide lactique est étudiée parallèlement avec les paramètres de croissance. Les résultats ont montré qu'en culture pure discontinue, *Lactococcus lactis* a un taux de croissance maximale de 1 h⁻¹ avec une production de 52mM de lactate à partir du lactosérum déprotéiné stérile.

Mots clés : *Lactococcus lactis*, lactosérum, acide lactique, bactérie lactique, fermentation.

SUMMARY:

The dairy sector generates an important quantity of waste. Among the waste, cheese whey represents a complex medium that essentially contains lactose and proteins. The "Fromagerie de Bevalala" produces 57 m³ of it per year. However, cheese whey contains 50 g/l of biochemical oxygen demand (BOD) which could generate ecological distress. To avoid this situation, many processes may be considered. Among them, lactic acid production by fermentation constitutes an interesting way. Therefore this study was about the lactic acid production of cheese whey by *Lactococcus lactis*, and homolactic acid bacteria strain is able to produce only L (+) lactic acid. Lactic acid is used extensively in cosmetic, medicinal, food and especially environmental. The first aim of the study consists of optimizing physicochemical parameters for the production of lactic acid. Then, we studied growth's parameters during fermentation. The best parameter obtained within a pure culture was a batch of *Lactococcus lactis* that produced 52mM of lactic acid with a maximal specific speed growth of 1 h⁻¹, on deproteinized and sterilized cheese whey.

Key words : *Lactococcus lactis*, cheese whey, lactic acid, lactic bacteria, fermentation.

Rapporteur : Docteur RAHARIJAONA Tovo Robin, Maître de conférences

Encadreur : Professeur RAHERIMANDIMBY Marson, Professeur titulaire

Adresse de l'auteur : C 77 E Ambodivondava SABOTSY – NAMEHANA (103)

Contact : 033 18 526 78 ou andrianadenis@yahoo.fr