République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr. Yahia Farés de Médéa
Faculté des sciences de la nature et de la vie

Mimoire de Fin d'etude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Theme

ESSAI D'UTILISATION DE LACTOSERUM DANS LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Présenté par: Atil Hicham.

Bellarbi Mohamed.

Bouchenafa Anes.

Soutenue publiquement le 23 juin 2022 devant les jurys composés de **:**

Président	Mr : Ainas. M	Maître de conférences B à l'Université de Médéa
Examinatrice	Melle : HOCEINI A	Maître de conférences B à l'Université de Médéa
Promotrice	Mme : BOUMEDIENE F	Maître de conférences B à l'Université de Médéa

Année Universitaire : 2021-2022

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr. Yahia Farés de Médéa
Faculté des sciences de la nature et de la vie

Mimoire de Fin d'etude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Theme

ESSAI D'UTILISATION DE LACTOSERUM DANS LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

Présenté par: Atil Hicham

Bellarbi Mohamed

Bouchenafa Anes

Soutenue publiquement le 23 juin 2022 devant les jurys composés de **:**

Président	Mr : Ainas. M	Maître de conférences B à l'Université de Médéa
Examinatrice	Melle : HOCEINI A	Maître de conférences B à l'Université de Médéa
Promotrice	Mme : BOUMEDIENE F	Maître de conférences B à l'Université de Médéa

Année Universitaire : 2021-2022

Dédicaces

Nous dédions ce travail à :

Nos chers parents,

Nos chers frères et sœurs,

Tous nos ami (e) s,

Et à tous ceux qu'on aime.

Remerciement

« Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu de nous avoir donné le courage et la patience pour accomplir ce travail »

Nous tenons à exprimer notre grand remerciement à nos très chers parents pour leur soutien moral et leur encouragement.

Nous tenons tout particulièrement à remercier Mme Boumediene. F pour l'encadrement de ce mémoire et pour la confiance qu'il nous a accordée, sa disponibilité, son aide et ses bons conseils.

Nos sincères remerciements vont aussi aux jurys Melle houceini et Mrc Ainas de nous avoir fait l'honneur de juger et examiner notre travail avec beaucoup d'attention.

Nous tenons à remercier toute l'équipe de laboratoire de faculté (Tifoura. Fatima. fayza) et l'équipe de hall technologique universitaire de Médéa Mouloud Sofiane le directeur de hall technologique et spécialement Benhaoua Meriem le chef de laboratoire chimie 2 pour leur aide et ses bons conseils.

Nous voulons remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, qui ont contribué l'accomplissement de ce travail.

Résumé

Le but de ce travail est d'utiliser du lactosérum doux, déprotéinisé et stérilisé comme matière première pour la production d'acide lactique par (*Streptococcus thermophiluse* et *lactobacillus belgaricus, lactococcus lactis ssp cremoris mésophile*, *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile*) ne produisant que l'acide lactique.

Le but de cette étude est également d'améliorer les paramètres physico-chimiques (température et pH) de la production d'acide lactique par ces bactéries sur du lactosérum doux, déprotéiné et stérilisé.

Les analyses physico-chimiques du lactosérum ont montré que ce dernier était de qualité adéquate et les résultats obtenus ont montré que le milieu à base de lactosérum est un bon milieu pour les expériences de fermentation tant qu'il contient des sucres fermentescibles.

La première partie est basée sur l'utilisation du lactosérum comme source de carbone pour la production d'acide lactique par les trois bactéries du laboratoire Sacco. Plusieurs séries de fermentation discontinue ont été réalisées afin d'étudier les besoins de ces souches et de les examiner parmi les souches ayant une bonne capacité d'acidification et de production d'acide lactique.

La deuxième partie est basée sur la mesure de l'acidité et l'estimation du métabolite secondaire produit par les trois souches bactériennes utilisées, puis l'élaboration des paramètres optimaux pour la souche examinée au cours des expériences. Qui contient la concentration maximale d'acide lactique.

Après la précipitation et le séchage du métabolite secondaire et l'obtention des différents échantillons, tous les échantillons ont été analysés par spectrophotomètre infrarouge, et l'analyse a confirmé que le précipité de formule est CH3CHOHCOO-Ca2+ qui est important pour le lactate de calcium.

Mots clés : lactosérum, acide lactique, lactate de calcium, spectrophotomètre infrarouge, fermentation lactique, source de carbone.

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو استخدام مصل اللبن الحلو المنزوع البروتين والمعقم كمادة خام لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة (lactococcus lactis ssp ،Streptococcus thermophiluse and lactobacillus belgaricus cremoris mesophilic، lactococcus lactis ssp cremoris thermophilic) التي تنتج فقط (Lactococcus lactis Lactococcus lactis ssp cremoris thermophilic)) حمض اللاكتيك.

يتمثل الهدف من هذه الدراسة أيضًا في تحسين المعلمات الفيزيائية والكيميائية (درجة الحرارة ودرجة الحموضة) لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة هذه البكتيريا على مصل اللبن الحلو المنزوع البروتين والمعقم.

أظهرت التحليلات الفيزيائية والكيميائية لمصل اللبن أن هذا الأخير يتمتع بجودة مناسبة وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الوسط المعتمد على مصل اللبن هو وسيط جيد لتجارب التخمير طالما أنه يحتوي على سكريات قابلة للتخمير.

يعتمد الجزء الأول على استخدام مصل اللبن كمصدر كربوني لإنتاج حمض اللاكتيك بواسطة البكتيريا الثلاثة من مختبر ساكو. تم إجراء عدة سلاسل من التخمر بطريقة غير مستمرة من أجل دراسة احتياجات هذه السلالات وفحصها بين السلالات التي تمتلك القدرة الجيدة على التحميض وإنتاج حمض اللاكتيك.

الجزء الثاني يعتمد على قياس الحموضة وتقدير المستقلب الثانوي الناتج عن السلالات البكتيرية الثلاثة المستخدمة ، ثم تطور المعلمات المثلى للسلالة التي تم فحصها أثناء التجارب. الذي يحتوي على أقصى تركيز لحمض اللاكتيك.

بعد ترسيب المستقلب الثانوي وتجفيفه والحصول على العينات المختلفة ، تم تحليل جميع العينات بواسطة مقياس الطيف الضوئي بالأشعة تحت الحمراء ، وأقر التحليل أن راسب الصيغة Ca2-CH3CHOHCOO + التي تعتبر مهمة لاكتات الكالسيوم.

الكلمات المفتاحية: مصل اللبن، حمض اللاكتيك، لاكتات الكالسيوم، مقياس الطيف الضوئي بالأشعة تحت الحمراء، التخمير اللبني، مصدر الكربون.

Abstract:

The objective of this work is to use deproteinized and sterilized sweet whey as raw material for the production of lactic acid by (Streptococcus thermophiluse and lactobacillus belgaricus, lactococcus lactis ssp cremoris mesophilic, lactococcus lactis ssp cremoris thermophilic) homolactic strains which produce only L (+) lactic acid.

The objective of this study also consists in optimizing the physicochemical parameters (temperature and pH) to produce lactic acid by these bacteria on deproteinized and sterilized sweet whey.

The physicochemical analyzes of whey showed that the latter has an adequate quality and the results obtained showed that the medium based on whey is a good medium for fermentation experiments as long as it contains fermentable sugars.

The 1st part is based on the use of whey as a carbon source for the production of lactic acid by the three bacteria from the Sacco laboratory. Several series of fermentations in discontinuous mode were carried out in order to study the needs of these strains and screened between the strains which possessed the good capacity for acidification and for the production of lactic acid.

The 2nd part is based on the measurement of acidity and the quantification of the secondary metabolite produced by the three bacterial strains used, then the evolution of the optimal parameters for the strain screened during the experiments. Which has a maximum concentration of lactic acidμ.

After the precipitation and drying of the secondary metabolite and the obtaining of the deferent samples, all the samples were analyzed by infrared spectrophotometer, the analysis approved that the precipitate of formula CH3CHOHCOO-Ca2+ which is significant of calcium lactate.

Key words: whey, lactic acid, calcium lactate, infrared spectrophotometer, lactic fermentation, carbon source.

Key words: whey, lactic acid, calcium lactate, infrared spectrophotometer, lactic fermentation, carbon source.

Table De Matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction Générale……..……...1

Partie Bibliographique

Chapitre 1 : Lactosérum

1.1.Définition ……..4

1.2.Types de lactosérum ……..…4

1.2.1. Lactosérum acide ……4

1.2.2. Lactosérum doux ……..…5

1.3.Source industrielle du lactosérum ……...5

1.4.Composition des lactosérums ……...6

1.5.Pouvoir polluant du lactosérum ……...7

1.6.Valorisation du lactosérum ……..…7

Chapitre 2 : Généralités sur la fermentation

1.1.Différents milieux de fermentation ……..8

a. Fermentation en milieu solide (FMS) ……..…8

b. Fermentation en milieu liquide (FML) ……..9

1.2.Types de fermentation ……..…9

1.2.1. Fermentation amylolytique ……..…..9

1.2.2. Fermentation acétique ……...….....9

1.2.3. Fermentation propénoïque ……...…10

1.2.4. Fermentation butyrique ……...…10

1.2.5. Fermentation alcoolique ……...…10

1.2.6. Fermentation lactique ……...11

1.2.7. Types de la fermentation lactique……...…..11

a- Fermentation homolactique ……..…....11

b- Fermentation hétérolactique ……..…..12

Chapitre 3 : Les bactéries lactiques

3.1. Définition des bactéries lactiques ……13
3.2. Utilisations des bactéries lactiques ……..14
3.3. Classification phylogénétique ……...…14
3.4. Métabolisme carboné chez les bactéries lactiques ……15
a. Transport des sucres ……..…15
b. Système perméase ……..……15
c. Système PTS ……..….16
3.5.Facteurs affectant la fermentation lactique…….….17
3.5.1. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques ……..18
a. Besoins en vitamines ……..18
b. Besoins en acides aminés……18
c. Besoins en éléments minéraux……..18
3.5.2. Influence du pH ……..…..19
3.5.3. inhibition par le substrat ……..…19
3.5.4. Inhibition par le produit ……..19

Chapitre 04 : Acide lactique

4.1.Généralités ……...…20
4.2.Propriétés physico-chimiques de l'acide lactique ……..….20
4.3.Production d'acide lactique ……21
4.3.1. Voie chimique ……..….21
4.3.2. Voie fermentaire ……...…21
4.4.Microorganismes producteurs d'acide lactique ……..22
4.4.1. Les bactéries ……..…22
Les lactobacilles ……..….22
Les bacilles ……..……22
Les lactocoques ……..…23
Culture mixte ……..…23
4.4.2. Les champignons ……24
4.4.3. Les levures ……24
4.5. Applications de l'acide lactique ……...25
4.5.1. L'industrie des polymères ……...….25
4.5.2. L'industrie alimentaire ……..…25

4.5.3. L'industrie cosmétique ……..26
4.5.4. L'industrie pharmaceutique 26
4.5.5. L'industrie chimique ……..…26
4.5.6. Autres utilisations ……...27
4.6. Les matières premières utilisées pour la production d'acide lactique…….....27

Partie Expérimentale

I -MATERIEL ET METHODES

1. Lieu et période de travail…….……..28
2. Objectifs de l'étude ……28
1. Matériel…….……...……28
1.1. Verrerie, appareils et produits chimiques…….……28
1.2. Milieu de culture …….……28
1.3. Bactéries lactiques ……...…….30
2. Méthodes analytiques ……..…….31
2.1.Revivification des souches ……31
2.2.Préparation de l'inoculum ……...…31
3. Collection et préparation de milieu de culture ……..…32
4. Inoculation de milieu de culture ……...…33
5. Condition de fermentation ……..33
6. Schéma des fermentations ……34
7. Mesure de pH……35
8. Mesure de l'acidité……..….35
9. Précipitation de l'acide lactique ……..…36
10. Analyse par Spectrophotométrie infrarouge ……38
Préparation de la Pastille de KBr ……....38
11. Dosage de lactose ……...…….39

II-RESULTATS ET DISCUSSION

1. Composition physicochimique du lactosérum……...40
2. Résultats de l'évolution de pH au cours de la fermentation ……41
3. Résultats de test d'acidification……..42

4. Résultats de mesure de l'acidité…….44
5. Criblage des souches productrices d'acide lactique……...45
6. Etude cinétique de la fermentation lactique…….…..45
7. pouvoir d'acidification globale de la souche choisie …….46
8. Evolution de production de l'acide lactique……...……47
9. Précipitation de lactate de calcium par hydroxyde de calcium…....48
Conclusion Général ……....51
Références Bibliographie ……..…….53
Annexes……..……..58

Liste
Des tableaux Des figures
Des abréviations

Liste Des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Différents types de lactosérum	**5**
2	La composition moyenne des lactosérums (en % d'extrait sec)	**6**
3	Caractéristiques des microorganismes producteurs d'acide lactique	**24**
4	Composition de différents types de lactosérum	**29**
5	Description des souches utilisées pour la Fermentation	**30**
6	Standard de Mc Farland	**32**
7	Les différentes températures et temps de fermentation pour chaque expérience	**34**
8	Composition moyenne du lactosérum de l'ORLAC de président Beni-Tamou (Blida)	**40**
9	évolution du ph pour chaque expérience	**41**
10	Pouvoir d'acidification globale des souches	**43**
11	Concentration de l'acide lactique en (g/l) pour chaque expérience après 72h	**44**
12	Les quantités maximales d'acide lactique produit par les souches cultivées sur le Même milieu de culture	**45**
13	Les conditions de culture choisies	**46**

Liste Des figures

Figures	Titre	page
1	Fermentation homolactique (voie homofermentaire)…	**12**
2	Fermentation hétérolactique (voie hétérofermentaire)	**13**
3	Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S	**15**
4	Différents types de systèmes de transport des sucres	**16**
5	*Système PTS*	**17**
6	Les deux sous formes isométriques optiquement actives D'acide lactique	**21**
7	Représentation schématique de deux processus de production d'acide lactique	**22**
8	Les voies de polymérisation vers l'acide poly-lactique	**25**
9	Réactivation des souches bactériennes	**31**
10	Courbe d'absorbance de différents Mc Farland à 600 nm.	**32**
11	Les étapes de préparation de milieux de culture	**33**
12	Préparation des Erlenmeyers pour la fermentation	**33**
13	Mesure de pH pour chaque Erlenmeyers	**35**
14	Dosage de l'acide avec NaOH	**36**
15	Filtration sous vide de mélange hydroxyde de calcium-acide lactique	**37**
16	L'appareille spectroscopie Infrarouge d'analyse de précipité finale après Séchage	**37**
17	Dispositif de fixation d'échantillons a analysée par infrarouge	**39**
18	L'évolution du ph pour chaque expérience à des températures et temps Différentes	**42**
19	L'évolution de la Pouvoir d'acidification globale des souches pour chaque expérience à des températures constantes et temps différentes	**43**
20	Représentation graphique de la production d'acide lactique selon lesExpériences	**44**
21	Evolution du pH au cours de la fermentation discontinue par *lactococcus lactisssp cremoris*	**46**
22	Evolution de la concentration des sucres totaux et la concentration d'acide Lactique, en fonction du temps	**47**
23	Spectres infrarouge de (A) l'hydroxyde de calcium et (B) Lactate de c	**48**

Liste Des Abréviations

DBO : Demande biochimique en oxygène

Ppm : Partie par million

FMS : Fermentation en milieu solide

FML : Fermentation en milieu liquide

NADH : Nicotinamide adénine dinucleotide Déshydrogénase

NAD: Nicotinamideadénine dinucleotide

ADP: Adenosine diphosphat

Pi: Phosphate inorganique

ATP: Adenosine triphosphate

Lb: Lactobacillus

LAB*:* Lacticacidbacteria

PTS: Phosphotransférase

BL: Bactéries lactique

Introduction Générale

Introduction Générale

Le monde a connu un développement très important dans le secteur industriel tandis qu'il y a toujours des risques et des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé publique. Pour cela, les écologistes et les biologistes se sont intéressés depuis longtemps aux procédés et techniques qui servent à limiter la pollution engendrée par les industries.

Parmi ces dernières, l'industrie laitière est une des plus polluantes par le rejet de quantités importantes de lactosérum. Du fait de sa richesse en élément nutritif tels que lactose, protéine solubles, vitamines hydrosolubles, matières grasses et les éléments minéraux, le lactosérum constitue un excellent milieu de culture pour les microorganismes, ce qui fait de lui un facteur de pollution redoutable (MICHEL, 1986)**.**Il réduit la vie aquatique en captant l'oxygène dissous (PANESAR, 2007), car un litre de lactosérum présente une demande biochimique en oxygène (DBO) élevée qui varie entre 35 et60 g/l. (BOUDJEMA K. F.-N., 2009)**.**

Pour diminuer le risque polluant du lactosérum et d'un coté de recyclage , ce dernier est utilisé dans différents domaines tels que l'alimentation humaine, l'alimentation animale et éventuellement dans le domaine de la biotechnologie afin de produire des protéines d'organismes unicellulaires(P.O.U.),enzymes, vitamines, alcool, acides organiques(acide citrique, acide lactique,…etc.). L'acide lactique ou acide α hydroxyde propionique est synthétisé soit par voie chimique soit par voie microbienne, il se présente sous deux formes optiquement actives, la configuration L (+) est lévogyre et la configuration D (-) est dextrogyre. L'isomère acide L lactique est préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de La lactate déshydrogénase dans l'être humain (NARAYANAN N. R., 2004) tandis que l'isomère acide D lactique est parfois dangereux au métabolisme humain et peut causer un acidose et décalcification (ZHANG, 2007)

Tandis que la fermentation est une méthode efficace et attractive pour produire un stéréo-isomère d'acide lactique sur des substrats moins chers avec des microorganismes hautement productifs et un taux de conversion élevée (DJUKIĆ-VUKOVIĆ, 2012) **.**

Malgré toutes ces caractéristiques utiles du lactosérum, il est mal valorisé et son utilisation dans l'industrie agro-alimentaire reste très limité, il est souvent jeter et éliminé après fin du procès de fabrication des fromages.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail qui vise à mettre en évidence l'importance et la valorisation du lactosérum ainsi L'optimisation des paramètres physicochimiques (température et temps de fermentation) pour produire de l'acide lactique par des trois bactéries lactiques.

Introduction Générale

Ce mémoire est décrit en deux parties :

- Une partie bibliographique construite en une synthèse et rappels sur les bactéries lactiques, lactosérum et l'acide lactique en voie fermentaire.

-Une seconde partie pratique qui énonce le matériel et les méthodes utilisés dans la préparation de lactosérum comme source de carbone et la réalisation de fermentation ensuite précipité d'acide lactique .

Cette partie se termine par la présentation et l'interprétation des résultats obtenus, une Conclusion et des perspectives.

Chapitre I :

Lactosérum

I- Lactosérum

1.1.Définition

Le lactosérum est un sous-produit de la transformation du lait en fromage, en caséine ou en dérivé de la caséine. Le lactosérum retient environ 55% des éléments nutritifs du lait, on le considère comme constituant essentiel du lait formant la phase hydrique (après séparation du Caillé) renfermant les substances ionisées en solution (sels, acides), moléculaires (lactose en particulier) et en vitamines hydrosolubles (surtout du groupe B). Il présente une teneur non négligeable en protéines de valeur nutritionnelle élevée, riche en Lysine et en Tryptophane et d'autre part bien équilibré en aminoacides soufrés grâce à sa teneur élevée en Cystéine (Chikh Mohamed Azim, 2001),Une règlementation stricte existe quant au traitement et au rejet de cet important coproduit industriel car il représente l'un des rejets industriels les plus polluants (Bergeron, 2014), qui peut être mieux valorisé et utilisé.

L'intérêt porté à ce produit dépend essentiellement de la fraction protéique, du lactose et des vitamines hydrosolubles qu'il renferme, les autres composés sont considérés très souvent comme des facteurs limitant de l'utilisation.

Chaque type de fromage correspond un lactosérum particulier, Il est donc impossible, du fait de la grande variété des fromages d'admettre une composition standard (Bergeron, 2014).

1.2.Types de lactosérum

Le lactosérum encore appelé sérum ou petit-lait, doit être considéré comme un produit dérivé plutôt qu'un sous-produit de la fabrication des fromages, ou de la caséine. On distingue deux types de lactosérums: celui résultant de la coagulation des laits non acides, par la présure, et qu'on appelle" lactosérum doux" et celui résultant, de la fabrication des fromages à pâtes fraîches, à pâtes molles ou de la caséine lactique appelé lactosérum acide" (Thilleli, 2019).

1.2.1. Lactosérum acide

Obtenu après la coagulation du lait par précipitation des caséines à leur ph isoélectrique de 4.6 par ajout d'acide fort ou d'acide lactique. La caséine est combinée à des sels de calcium, l'acidification entraîne sa déminéralisation qui fait passer dans le sérum une part importante d'élément minéraux, notamment le calcium et le phosphore. Les lactosérums acides sont moins riches en lactose et plus riche en minéraux. Ils sont aussi plus ensemencés en germes lactiques et moins sujets à des fermentations que les lactosérums doux. Les teneurs élevées en

acide lactique et en minéraux posent des difficultés pour la déshydratation; aussi les lactosérums acides sont souvent utilisés à l'état liquide alors que les sérums doux sont généralement déshydraté (ADRIAN, 1981).Le lactosérum acide provient de la fabrication des pâtes fraîches et des pâtes molles, son pH varie entre 4.5 et 5.

Tableau 1.1: Différents types de lactosérum (ADRIAN, 1981)**.**

Degré d'acidité	Type	pH	Production
<18 °D	**Lactosérum doux**	6,5 ± 6,7	Fromagerie à pâte pressée
			Fromagerie à pâte cuite
			Caséinerie présure
>18 °D	**Lactosérum acide**	4,5 – 5,5	Fromagerie à pâte fraiche
			Fromagerie à pâte molle
			Caséinerie acide

1.2.2. Lactosérum doux

Il est obtenu après la coagulation de la caséine sous l'action de la présure sans acidification préalable, on obtient alors un sérum doux, pauvre en sels minéraux et riche en lactose et en protéines. En plus des protéines solubles du lait, ce type de lactosérum contient une glycoprotéine qui provient de l'hydrolyse de la caséine par la présure. Lorsque le lactosérum de fromagerie n'est pas traité avec toutes les précautions nécessaires, la poursuite de la fermentation naturelle augmente son acidité. Le lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte pressée cuite ou non cuite est de pH variant entre 5 et 6,3. (ADRIAN, 1981)

1.3.Source industrielle du lactosérum

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

La beurrerie : c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait mature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation ou obtient du «lactosérum écrémé». (Sia Abdelhak, 2020)**.**

La fromagerie: c'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait mature, ce dernier subit les processus de coagulation et de synérèse, aboutissant

d'une part à une phase solide le «fromage», et d'autre part à une phase liquide «le lactosérum» (Sia Abdelhak, 2020).

1.4.Composition des lactosérums

Tableau 1.2 : la composition moyenne des lactosérums (en % d'extrait sec) (Malika, Meziane, 2008).

Paramètres	Lait %	Lactosérum % doux	Lactosérum % acide
Eau	87,6	93,5	93,5
Matière sèche	12,4	06,4	06,5
Matière grasse	03,4	0,05	0,04
Protéine soluble	0,70	0,55	0,55
Azote non protéique	0,50	0,18	0,18
Lactose	04,7	04,8	04,9
Sels	00,9	00,5	00,8
Acide lactique	01,5	0,05	00,4

En industries fromagères, la plus grande partie de l'eau contenue dans le lait se retrouve dans le lactosérum et avec elle, toutes les substances solubles: le lactose, les protéines solubles et des peptides, les sels minéraux solubles (lactates, chlorures ...) et les matières grasses, Les protéines présentes sont les matières azotées ne précipitant pas, elles représentent 20% des protéines du lait, ce sont les albumines (75%), les globulines (10%) et divers autres (15%). Pour un litre de lactosérum en sortie d'usine, 66g de matières sèches sont récupérés soit: 49g de lactose (69-75%), 8g de protéines solubles (10-13%), 5g de cendres (5-8%) et 4g de matières grasses (4-7%), Le lactosérum est un aliment intéressant non seulement par la présence du lactose, mais aussi par la teneur en protéines riches en acides aminés indispensables (lysine et tryptophane) et par la présence de nombreuses vitamines du groupe B (thiamine, acide pantothénique, riboflavine) (Thilleli, 2019).

1.5.Pouvoir polluant du lactosérum

Le lactosérum est un sous-produit de l'industrie fromagère, lorsqu'il est déversé dans une rivière ; il engendre des effets polluants : les bactéries et autres micro-organismes vivants dans l'eau, attaquent certains constituants du lactosérum (*lactose principalement*) en consommant l'oxygène de l'eau. Ce dernier manquera aux poissons et aux plantes aquatiques qui mourront d'asphyxie (MERYEM, 2020)**.** Le rejet du lactosérum est considéré comme un polluant car il impose une forte demande biochimique en oxygène (DBO), de 30000-50000 ppm (MERYEM, 2020)**.**Ces torts causés à l'environnement pourraient être évités d'autant que le lactosérum est une matière noble dont il y a encore beaucoup à tirer.

1.6.Valorisation du lactosérum

Au lieu de les détruire, le lactosérum est valorisé en l'additionnant à l'alimentation animale ou humaine. Les possibilités d'utilisation du lactosérum dans l'alimentation humaine sont très variées comme dans la panification, la confiserie, la chocolaterie, les sauces, les condiments ou les boissons. Toutefois, la teneur relativement élevée en sels ainsi que la dilution excessive des constituants rendent nécessaires certains traitements pour mieux adapter la composition du produit aux diverses utilisations industrielles. La mise en valeur du lactosérum passe par la séparation de ces différents constituants utilisant des techniques diverses et variées (concentration, dessiccation, extraction des protéines et du lactose par filtration, précipitation). Il est possible également de fabriquer des boissons rafraîchissantes et nutritives à partir de lactosérum déprotéinisé ou fermentées en présence de jus de raisin (morabito, 1994)**.**

Divers procédés existent actuellement pour récupérer les constituants du lactosérum.

L'un d'entre eux consiste à concentrer les protéines laitières par filtration. À l'intérieur de ce procédé, le filtrat, ou concentré de protéines de lactosérum, peut être directement ajouté aux fromages et au yaourt afin d'en augmenter la valeur nutritive et la qualité des produits, ou encore séché et vendu sous la forme d'une poudre alimentaire (Bergeron, 2014)**.**

Aussi, différentes technologies et procédés ont été développés afin de diminuer l'impact environnemental de la gestion du lactosérum en produisant des sous-produits à valeur ajoutée (Arevalo, 2017)**.**

Le lactosérum non modifié est communément utilisé pour l'alimentation du bétail et la production de boissons. De plus, la valorisation du lactosérum réalisée à partir de technologies diverses permet d'obtenir de nombreux produits.

Le lactosérum est transformé en poudre de lactosérum ou en ses variantes déminéralisées, déprotéinées ou délactosées. Également, il peut être valorisé sous forme de concentrés protéiques, d'isolat de protéines sériques, du lactose ou d'autres fractions (Trivino Arevalo, 2017).

Chapitre II: Généralités sur la fermentation

Généralités sur la fermentation

La fermentation c'est tout processus métabolique au cours duquel est utilisé un microorganisme spécifique pour la libération de l'énergie contenue dans une molécule organique, Ce processus ne nécessite ni d'oxygène ni de chaine de transport, et utilise une molécule organique comme accepteur d'électron final. La fermentation peut parfois se poursuivre en présence de l'oxygène (Dalal, 2018)**.**

La fermentation microbienne est un procédé qui consiste à faire croître une population de micro-organismes *(bactéries, levures, moisissures...)* aux dépens de certains éléments nutritifs sous des conditions environnementales (température, pH, agitation, aération...)favorables. Elle correspond à la transformation de substances (substrats carbonés généralement) en produits résultant de l'activité métabolique des cellules (Palacio, 2007)**.**

1.1.Différents milieux de fermentation

a. Fermentation en milieu solide (FMS)

Elle a été définie de plusieurs façons selon les auteurs. Quelques définitions sont présentées ici.

Procédé microbien se produisant principalement à la surface des matrices solides qui ont la propriété d'absorber ou de contenir de l'eau, avec ou sans nutriments solubles (Viniegra-González, 2003)**.**

Culture de microorganismes sur des matrices solides humides, soit sur des supports inertes, soit sur des substrats insolubles pouvant être utilisés comme source de carbone et d'énergie (Pandey, 2000)**.**

Procédé où la croissance des microorganismes se fait sur des substrats ou supports solides ou semi-solides. (ROSALES, 2007)**.**

Bioprocédé réalisé en l'absence d'eau ou en la quasi-absence d'eau libre. Cependant, le substrat doit posséder suffisamment d'humidité pour supporter la croissance et l'activité métabolique du micro-organisme. La matrice solide peut être la source de carbone(ou d'autres nutriments), ou un matériau inerte pour soutenir la croissance des micro-organismes (avec une solution de croissance imprégnée) (Thomas L, 2013)**.**

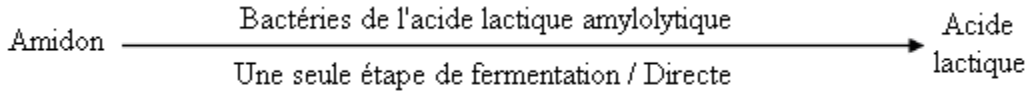
b. Fermentation en milieu liquide (FML)

La fermentation sur milieu liquide peut être considérée comme une violation de l'habitat naturel des microorganismes, en particulier *les champignons*. Elle consiste à faire croître les microorganismes sur un substrat nutritif liquide. Ce type de fermentation a été traditionnellement utilisé pour la production industrielle des enzymes, des acides organiques en raison de la facilité de contrôle des différents paramètres comme le pH, la température, l'aération, l'oxygène dissous et l'humidité, (Zenati, 2018)**.**

1.2.Types de fermentation

1.2.1. Fermentation amylolytique

Beaucoup de publications et de revues sur la fermentation amylolytique sont apparues, ce qui montre l'importance de celle-ci. Les bactéries de l'acide lactique amylolytique peuvent convertir directement l'amidon en acide lactique en une seule étape, ceci éliminerait le processus de deux étapes comportant l'hydrolyse enzymatique suivi de la fermentation microbienne pour aboutir à un résultat plus économique (Reddy G, 2008)**.**



1.2.2. Fermentation acétique

Il se forme de l'acide éthanoïque à partir de l'éthanol

$$\mathbf{C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O + Energie}$$

Ethanol Dioxygène Acide èthanoique

Remarquons que cette fermentation est aérobie, l'oxydation nécessitant l'oxygène de l'air pourvoir lieu. C'est à **Louis Pasteur (1808-1873)** que nous devons la découverte de la nature biochimique du processus de formation du vinaigre. A partir de 1865, sur la base des recherches de Pasteur, la production industrielle de vinaigre a connu un grand essor. La bactérie du vinaigre *"acétobacter"* se développe dans le vin non bouché. Les petites mouches qui sont fortement attirées par le vin placé à l'air libre et qu'on appelle mouches du vinaigre (*drosophiles*) véhiculent l'acétobacter. Les bactéries de l'acide acétique forment une couche à la surface que l'on appelle la mère du vinaigre. *L'acétobacter* utilise pour vivre l'énergie libérée par l'oxydation. Les processus qui ont lieu en présence d'oxygène de l'air sont dits

aérobies. Toute solution alcoolique diluée peut donner de l'acide acétique; dans ce cas le taux d'alcool correspond à la quantité d'acide acétique qui résultera de la transformation (dalal, 2018).

1.2.3. Fermentation propénoïque

De l'acide propénoïque, de l'acide éthanoïque ainsi que du CO2 et du dihydrogène se forment (Henry-Eric, 1998).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 - CO_2H + CH_3 - CH_2 - CO_2H + CO_2 + H_2 + Energie$$

1.2.4. Fermentation butyrique

Il se forme de l'acide botanique, du CO_2 et du dihydrogène à partir de l'acide lactique déjà formé par fermentation lactique.

$$2CH_3 - CH(OH) - CO_2H \rightarrow CH_3 - CH_2 - CH_2 - COOH + 2CO_2 + 2H_2 + Energie$$

L'acide butyrique est responsable de l'odeur putride et du goût piquant de certains Fromages à pâte cuite. Cette fermentation a lieu sous l'effet des bactéries *Clostridium butyricum* (dalal, 2018).

1.2.5. Fermentation alcoolique

Est un processus biochimique par lequel des sucres (glucides, principalement le glucose)sont transformés en alcool (éthanol)dans un milieu liquide, privé d'air. (dalal, 2018).

La fermentation a pour but de réoxyder le NADH (Nicotinamide adénine dinucleotide Déshydrogénase structure d'une énergie) en NAD (Nicotinamide adénine dinucleotide) car NAD est une molécule qui est limitée, et si elle n'est plus présente, la glycolyse ne peut plus avoir lieu.

La fermentation est donc là pour assurer la continuité de la glycolyse. Ensuite, de chaque molécule de pyruvate, une molécule de dioxyde de carbone est détachée. On obtient de l'acétaldéhyde, un produit extrêmement nocif pour l'organisme, elle va donc être rapidement transformée. L'acétaldéhyde est transformé en éthanol, suite à l'oxydation de NADH en NAD+.L'équation finale de la transformation du glucose en éthanol s'écrit :

$$Glucose + 2ADP + 2Pi \rightarrow 2ethanol + 2CO_2 + 2ATP$$

1.2.6. Fermentation lactique

On entend par fermentation lactique la transformation de certains sucres tels que: sucre de lait, glucose, sucre de canne *(lactose)* en un acide liquide et soluble dans l'eau, qui est l'acide lactique. La fermentation lactique concerne une part importante des produits alimentaires. On peut citer pour les produits animaux : les laits fermentés, les fromages et pour les produits végétaux : le vin, le pain au levain, la choucroute, les olives, etc. Cette fermentation met en jeu des bactéries lactiques qui sont de plus en plus souvent des bactéries lactiques sélectionnées, produites par des industries spécialisées (Henry-Eric, 1998)**.**

Il se forme de l'acide lactique à partir du glucose

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3$$

L'acide lactique ayant comme formule semi-développée :

$$CH - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - COOH$$

La fermentation malolactique est un cas particulier, l'acide lactique se formant au détriment de l'acide malique :

$$COOH - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - CH_2 - COOH \rightarrow COOH - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - CH_3 + CO_2 + Energie$$

Acide malique **Acide lactique**

Elle est homolactique quand sous l'action de bactéries homofermentaires l'acide lactique est majoritaire. Parmi les bactéries homofermentaires des bactéries des genres*Lactococcus, Lactobacillus et Streptococcies* (IMENE, 2020) **.**

La fermentation lactique peut être hétéro lactique quand sous l'action de bactéries hétéro fermentaires on obtient de l'acide lactique et d'autres produits, éthanol, acide éthanoïque, dioxyde de carbone. Parmi les bactéries hétérofermentaires des bactéries des genres*Leuconostoc* et certains *Lactobacilles* (Palacio, 2007).

1.2.7. Types de la fermentation lactique

c- Fermentation homolactique

Dans la voie homo-fermentaire, le principal produit final est le lactate. La voie homolactique empreinte la voie de la glycolyse ou voie d'Emden-Meyerhof-Parnas (EMP)**(Figure 1).**

Lors de cette étape, le glucose est converti en deux molécules de pyruvate, avec phosphorylation de deux molécules d'ADP en ATP.

Le pyruvate est ensuite converti en lactate par le lactate déshydrogénase, ce qui permet la réoxydation des cofacteurs. La réaction bilan est la suivante :

Glucose + 2 ADP + 2 Pi -------- 2 lactate + 2 ATP

Les genres *Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus* et *Pediococcus*constituent quelques genres de bactérie lactique homo-fermentaires. Selon l'espèce, les *Lactobacillus* peuvent être soit homo-fermentaires soit hétéro-fermentaires. Par exemple : *Lb. delbrueckii, Lb. acidophilus*et *Lb. helveticus*sonthomofermentaires ou homolactiques. (Fessard, 2017)**.**

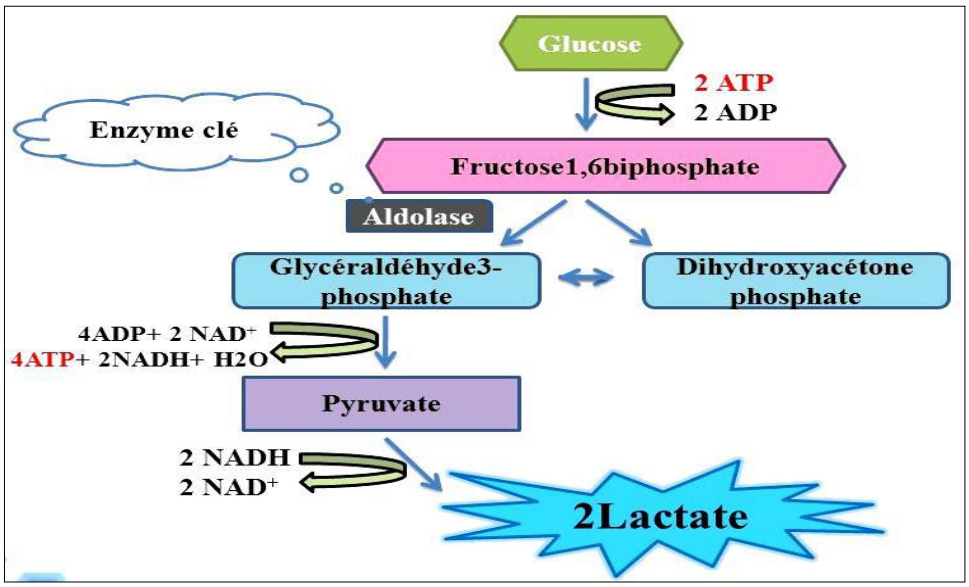


Figure 1 : Fermentation homolactique (voie homofermentaire) (IMENE, 2020)

d- Fermentation hétérolactique

Dans la voie hétéro-fermentaire, en plus de l'acide lactique, du dioxyde de carbone (CO_2), de l'éthanol ou de l'acétate peuvent être également produits (**Figure 2).**

La voie hétéro-fermentaire empreinte la voie des pentoses phosphate pour convertir le glucose. Le bilan de la réaction est le suivant :

Glucose + ADP + Pi ------- éthanol + lactate + CO2 + ATP + acétate

Parmi les bactéries hétéro-fermentaires, on trouve les genres *Leuconostoc, Weissella, Oenococcus* et certaines espèces de *Lactobacillus : Lb. brevis, Lb. hilgardii* sont parmi les espèces *Lactobacillus* hétéro-fermentaires. Tandis que, *Lb. plantarum, Lb. paraplantarum*et*Lb. pentosus* sont hétéro-fermentaires facultatives. L'éthanol est le composé le plus important pour l'obtention de boissons alcoolisées, telles que le vin ou la bière. La production de dioxyde de carbone apporte des caractéristiques sensorielles particulières au produit, comme un effet pétillant ou rafraichissant. Le CO2 participe également à la levée de la pâte à pain pendant la fermentation et permet d'obtenir une texture aérée. Certaines

bactéries lactiques sont capables de produire une part d'acide acétique également. (Fessard, 2017)**(Figure 2).**

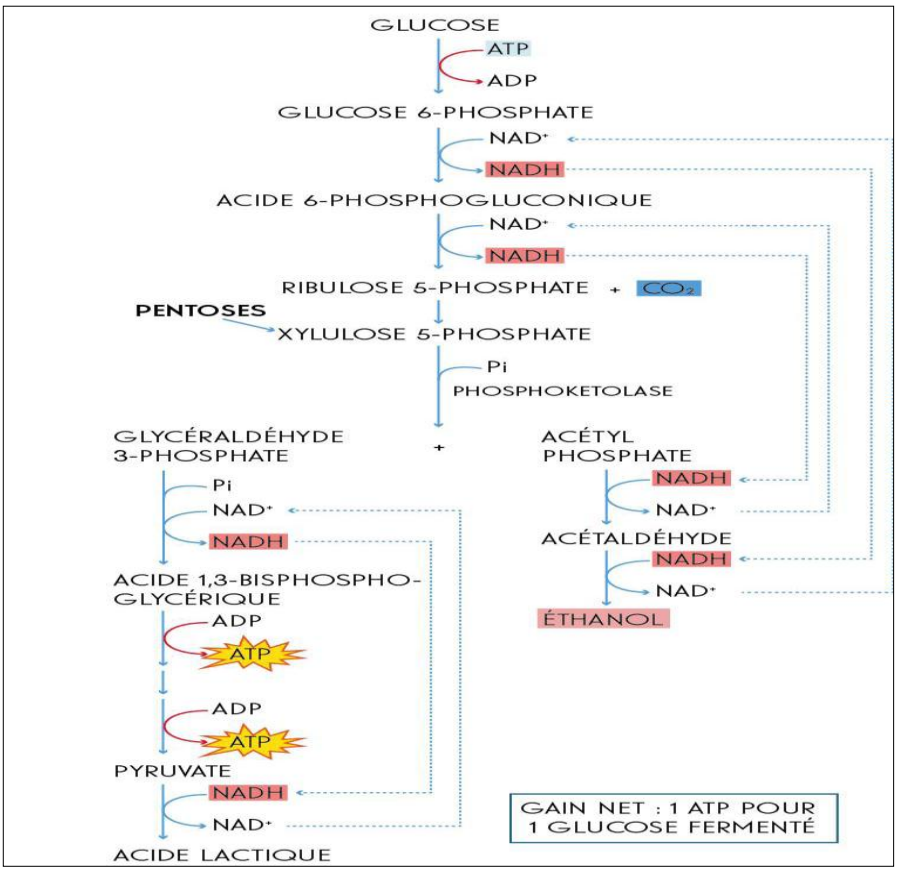


Figure 2 : Fermentation hétérolactique (voie hétérofermentaire) (IMENE, 2020)**.**

Chapitre III : Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques

3.1.Définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (*lacticacidbacteria, LAB*) ou bactéries de l'acide lactique sont un groupe hétérogène de microorganismes qui ont la capacité de produire de l'acide lactique comme produit principal à partir de la fermentation des sucres (SLIMOUNE, 2020)**.**

Les bactéries lactiques (BL) sont définies comme des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes ou chimioorganotrophes, Le terme fait référence au fait que l'acide lactique est le produit final de la fermentation glucidique de ces bactéries (Djahida, 2019)**.**

Elles sont à Gram positif, généralement immobiles, asporulées, catalase négative, oxydase négative généralement nitrate réductase négative, ce sont des bactéries anaérobies facultatives. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes pour les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles.

Les bactéries lactiques sont très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, ou des végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux.

3.2.Utilisations des bactéries lactiques

Domaine médical

Les bactéries lactiques interviennent dans le contrôle des infections intestinales comme la prévention des diarrhées par l'introduction d'une nouvelle flore intestinale qui agit sur les entérobactéries responsables de ces désordres intestinaux.

Elles sont aussi connues pour la production des agents antimicrobiens évitant ainsi l'usage des antibiotiques. Les bactéries lactiques colonisent l'intestin de la plupart des animaux, jouant un effet sur leur système immunitaire, souvent, en tant que probiotique pour améliorer certaines fonctions biologiques de leur hôte (Mermouri, 2018)**.**

Domaine alimentaire

Les bactéries lactiques appartiennent à un groupe de bactéries qui possèdent le "statut GRAS" ce qui autorise officiellement leur usage dans les applications alimentaires Ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits : les saucissons, les laits fermentés, les fromages,

les olives fermentés et certains vins. Parmi ces applications, l'industrie laitière est, sans doute, le plus grand utilisateur de ferments lactiques commerciaux (ROUMAISSA, 2021)

3.3.Classification phylogénétique

Les bases générales de classification des bactéries lactiques sont reliées aux travaux **d'Orla-Jensen (1924).** La classification des genres de bactéries lactiques était basée sur la morphologie, le mode de fermentation du glucose, la croissance sous certaines températures et le mode d'utilisation du sucre. Même si la taxonomie a été révisée depuis lors, les caractères utilisés par **Orla-Jensen** sont encore très importants dans la classification actuelle des bactéries lactiques, Les bactéries lactiques constituent un groupe de bactéries ayant des similitudes morphologiques, métaboliques et physiologiques, et elles sont étroitement apparentées phylogénétiquement (Tamine, 2019)**(Figure 3).**

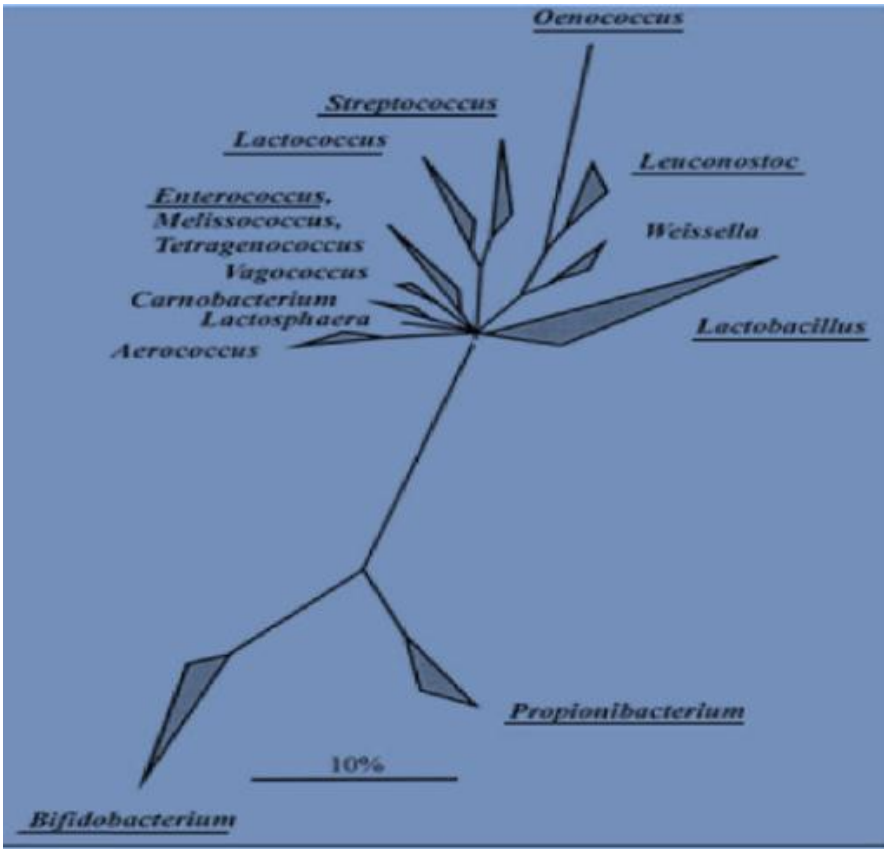


Figure 03 : Arbre phylogénétique des principaux genres de bactéries lactiques et des genres Associés, obtenu par analyse des ARNr 16S **(MERYEM, 2020)** .

L'accord commun est qu'il existe un groupe central composé de quatre genres; *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus et Streptococcus*. Des révisions taxonomiques récentes ont proposé plusieurs nouveaux genres et le groupe restant comprend maintenant ce qui suit : *Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus et Weissella.* Les

lactobacilles, les *carnobactéries* et certaines *Weissella* sont des bâtonnets tandis que les genres restants sont des coques (Tamine, 2019)**.**

3.4.Métabolisme carboné chez les bactéries lactiques

a. Transport des sucres

L'évènement initial du métabolisme des sucres est leur transport à travers la membrane cytoplasmique. L'entrée des sucres dans la cellule nécessite la présence de systèmes de transport localisés au niveau de la membrane. Chez les bactéries, trois types de systèmes existent, primaire, secondaire et groupe de translocation (Aarnikunnas, 2006)

b. Système perméase

Le système perméase énergie-dépendant **Figure 4**, fait pénétrer les sucres sous forme libre, Une enzyme membranaire (ATPase) couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie des 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 (Aarnikunnas, 2006).

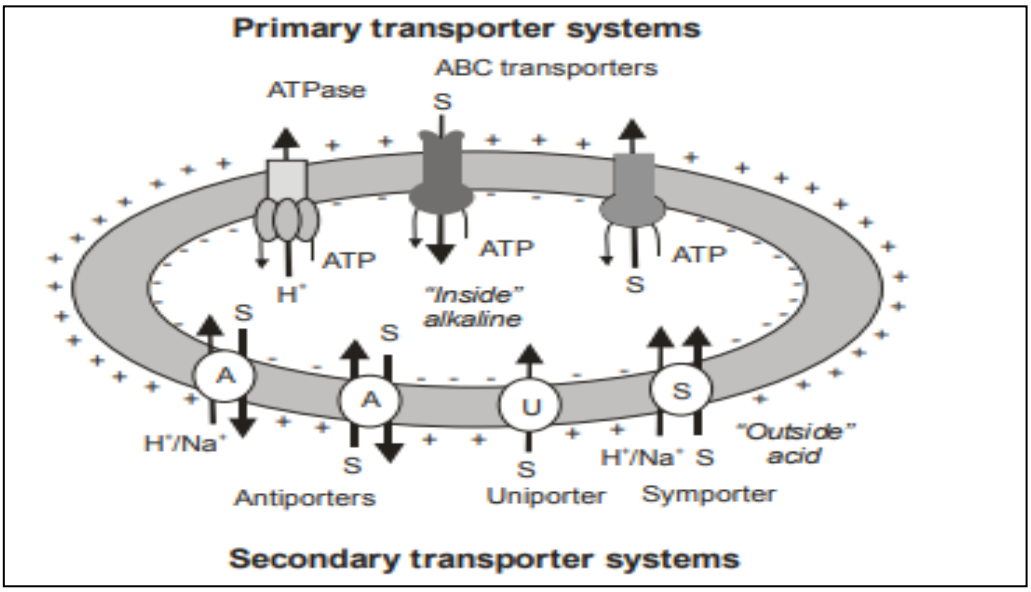


Figure 4 : Différents types de systèmes de transport des sucres (Aarnikunnas, 2006)**.**

c. Système PTS

Le système PTS (**phosphotransférasePEP-dépendant**) est impliqué dans le transport et la phosphorylation des sucres chez les bactéries **Figure 5.** De point de vue bioénergétique le système PTS est le plus favorable que le système perméase. En effet, il couple l'entré et la phosphorylation du sucre avec la dépense d'une molécule de PEP tandis que l'accumulation

du sucre par un système non-PTS nécessite la dépense de plus d'un équivalent ATP car le transport et la phosphorylation ATP-dépendante sont physiquement séparés.

Différentes protéines sont impliquées dans ce système, les deux protéines de couplage énergétique, l'enzyme I (EI) et HPR, sont communes à tous les systèmes, alors que les complexes « enzymes II » (EIIS) sont spécifiques du sucre et impliqués dans son transport. Le métabolisme du lactose, de glucose et de galactose est de pertinence spéciale pour l'industrie laitière. Selon la littérature, le système PTS impliqué dans le transport du glucose chez *Lactococcuslactis* est en fait un PTS mannose (PTS man) qui présente une forte affinité pour le glucose, le mannose, mais aussi le fructose et la glucosamine. Le glucose est transporté et phosphorylé simultanément par le EIIA en glucose 6-phosphate, le point d'entrée dans la voie de la glycolyse. Le deuxième système PTS est le PTS glucose qui enhibe la spécificité au glucose et au méthyle glucoside décrit pour quelques souches. Alternativement, le glucose peut être transporté via une perméase et phosphorylé plus tard par une glucokinase ATP dépendante (Tamine, 2019)**.**

Les *Lactococcilactis* sont également capables de métaboliser le lactose. Son entrée dans la cellule s'effectue via un PTS spécifique de lactose pour donner le lactose 6-phosphate ou bien par une perméase. Le lactose 6-phosphate est hydrolysé par la suite par la phospho-β-galactosidase pour produire le galactose 6-phosphate et le glucose. Après la phosphorylation via la glucokinase le glucose peut entrer la glycolyse tandis que le galactose 6-phosphate est ensuite métabolisé en intermédiaires de la glycolyse DHAP et en glyceraldehyde 3-phosphate par trois enzymes de la voie de tagatose 6-phosphate (Tamine, 2019)**.**

Le saccharose chez quelques souches de Lactococcuslactis entre dans la cellule par un PTS spécifique du saccharose pour former le saccharose 6-phosphate qui est hydrolysé par la suite en glucose 6-phosphate et en fructose. Pour entrer dans la voie de la glycolyse le fructose est phosphorylé par une fructokinase ATP dépendante (Aarnikunnas, 2006)**.**

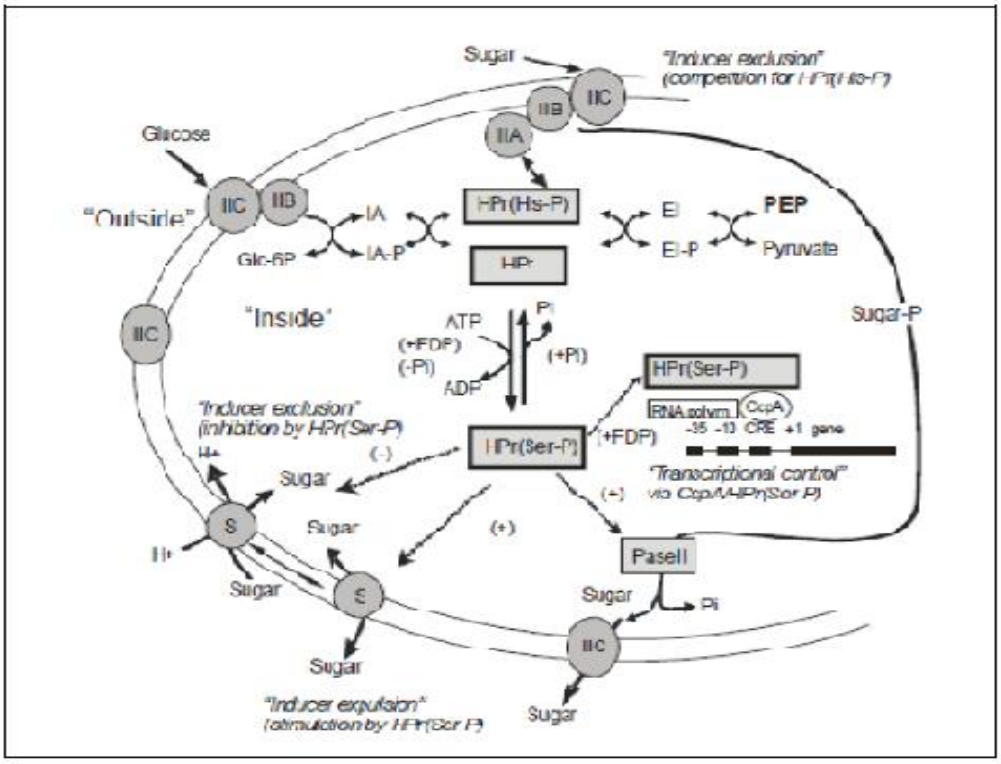


Figure 5 : Système PTS (Aarnikunnas, 2006)

3.5.Facteurs affectant la fermentation lactique

3.5.1. Besoins nutritionnels des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont très exigeantes au point de vue nutritionnel. Elles requièrent pour leur croissance non seulement des substrats azotés, carbonés et phosphatés mais aussi des facteurs de croissance telle que les vitamines, les acides aminés et éléments minéraux on les voir en suit.

a. Besoins en vitamines

Elles jouent un rôle primordial dans le métabolisme cellulaire. Les bactéries lactiques sont incapables de synthétiser de vitamines d'où l'importance d'un apport exogène en vitamines au milieu de culture (Yassine, 2017)**.**

Ont besoin de plusieurs vitamines du groupe B, en particulier l'acide pantothénique (B5), la biotine (B8), la thiamine (B1), la niacine (B3) et la cobalamine (B12), La déficience en vitamine B12 pouvant provoquer une diminution de la synthèse de l'ADN où monument de la division cellulaire ce qui entrainera un changement de la morphologie des cellules qui deviennent filamenteuse (Boulkhiout S, 2021)**.**

b. Besoins en acides aminés

Les bactéries lactiques exigent la fourniture exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont, pour la plupart, incapables d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple, précisent que, dans un milieu «synthétique», les *streptocoques* du groupe N ont généralement besoin au moins de leucine, d'isoleucine, de valine, de méthionine, d'arginine, d'histidine, d'acide glutamique et, pour certaines souches, de phénylalanine, de proline et de cystine. Dans le lait, les concentrations en acides aminés libres sont trop faibles pour permettre aux levains lactiques de croître abondamment (Nesrine, 2019)**.**

c. Besoins en éléments minéraux

Les éléments minéraux jouent un rôle essentiel dans la croissance des bactéries lactiques et précisément dans les activités enzymatiques bactériennes. Certaines espèces telles que *Leuconostocmesenteroides* ne peuvent pas croître en absence d'ions minéraux, ce qui indique l'exigence absolue pour ces éléments.

Le magnésium C'est un activateur des différentes réactions métaboliques : division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique. Cet ion est indispensable pour la croissance de *Lb helveticus.*

Le potassium est un cofacteur de nombreuses enzymes. Une concentration élevée de potassium est nécessaire pour la synthèse des protéines et la régulation du pH intracellulaire.

Les exigences en ions minéraux peuvent varier d'une espèce à autre. Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+}, K^{+} et Cl^{-} ont été des composants essentiels dans le milieu de culture de *Lb plantarum*. Tandis que Zn^{2+}, Fe^{2+} et Mg^{2+} avait un effet significatif sur la croissance de *Lactococcuslactisssp* (Abdelali, 2021)**.**

3.5.2. Influence du pH

La majorité des bactéries lactiques se multiplient préférentiellement à des pH voisins de la neutralité (6,5 à 7,5), mais elles sont capables de croître dans une large gamme de pH.

La croissance bactérienne est inhibée lorsque le pH du milieu devient acide, Le pH influence sur la croissance des bactéries lactiques mais il peut aussi agir sur la voie de fermentation des sucres (homo ou hétéro fermentaire), le rendement de la fermentation, et l'isomérie de l'acide lactique formé (Moussa Ben Lahmer et autres, 2019)**.**

3.5.3. Inhibition par le substrat

L'inhibition par le substrat semble dépendre du microorganisme et de la source de carbone.

Une augmentation de la concentration initiale du glucose fait retarder la croissance de *Lactobacillus delbrueckii* et de *Lactobacillus bulgaricus* en réduisant la productivité spécifique et le rendement de production d'acide lactique. Une telle inhibition n'a pas été observée en utilisant *Lactobacillus casei* sur saccharose jusqu'à 100 g/l, *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus pentosus* sur xylose jusqu'à 20 g/l et *Lactobacillus helveticus* sur lactose jusqu'à 110 g/l. Pour minimiser cette inhibition, le substrat peut être ajouté au milieu de fermentation selon le procédé Fed-batch (Tamine, 2019)**.**

3.5.4. Inhibition par le produit

L'acide lactique exerce un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire au cours des fermentations.

L'inhibition de la croissance est probablement due à l'augmentation de la pression osmotique et aussi à certains sous-produits de fermentation tels que l'acide formique, l'acide acétique ou bien le formiate de sodium qui peuvent exercer des effets inhibiteurs.

Pour atténuer l'effet de l'inhibition, diverses stratégies ont été utilisées, parmi lesquelles l'utilisation de technologies de fermentation capable de retirer l'acide lactique au fur et à mesure de sa production.

La neutralisation d'acide lactique pour donner une forme dissociée qui a un effet inhibiteur moindre pour l'adaptation du microorganisme et/ou l'utilisation de cultures mixtes (Tamine, 2019)**.**

Chapitre IV : Acide lactique

Acide lactique

4.1.Généralités

L'acide lactique est le produit final de la glycolyse par la voie d'Embden-Meyerhof, pour aboutir à la formation de l'énergie nécessaire aux bactéries lactiques homofermentaires.

L'acide lactique est synthétisé par voie chimique ou microbienne et il est le plus simple des hydroxyacides contenant un carbone asymétrique, c'est l'un des plus anciens acides organiques connus, il a été isole du lait aigre par le chimiste suédois SCHELLE en 1780.

En 1808, Jöns Jacob Berzelius constate que l'acide lactique est également produit dans les muscles pendant l'effort.

Louis Pasteur en 1857 a découvert le lactobacille et son rôle dans la fabrication de l'acide lactique.

Cette acide a commencé être produit commercialement par l'entreprise pharmaceutique allemande BoehringerIngelheim dès 1895 (naima, 2018)**.**

4.2.Propriétés physico-chimiques de l'acide lactique

L'acide lactique est un acide organique à trois carbones: un atome de carbone terminal faisant partie d'un groupe carboxyle, l'autre atome de carbone terminal faisant partie d'un groupe hydrocarboné ou méthyle et un atome de carbone central ayant un groupe de carbone de l'alcool.

L'acide lactique existe sous deux formes isométriques optiquement actives:

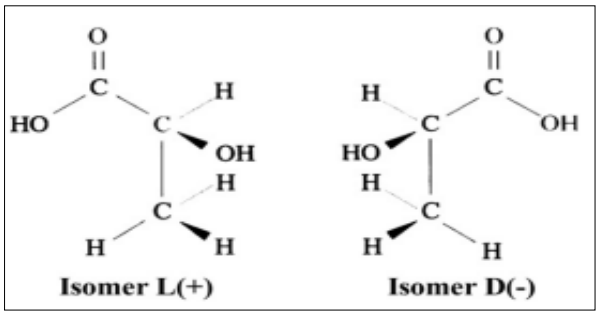
L'une est connue sous le nom d'acide (L)-lactique ou (s)-lactique et l'autre est connue sous le Nom de (D)-lactique ou l'acide (r)-lactique **Figure 6**. L'acide (L)-lactique est l'isomère important biologiquement (ren, 2011).

Le comportement chimique de l'acide lactique est déterminé par ses propriétés physico-chimiques, parmi lesquelles **a**) le caractère acide dans le milieu aqueux; **b**) la réactivité bi-fonctionnelle associée à la présence de groupe carboxyle et de groupe hydroxyle ce qui lui donne une grande réaction polyvalente et **c**) l'activité optique asymétrique de C2. (Martinez, 2013)**.**

-Il est miscible dans l'eau ou dans l'éthanol et il est hygroscopique.

-Il est très peut volatil et incolore.

Figure 6 : les deux sous formes isométriques optiquement actives D'acide lactique.



4.3.Production d'acide lactique

4.3.1. Voie chimique

Le processus commercial de la synthèse chimique d'acide lactique est basé sur le lactonitrile (NARAYANAN N. R., 2004).Du cyanure d'hydrogène est ajouté à de l'acétaldéhyde en présence d'une base pour produire du lactonitrile (NARAYANAN N. R., 2004**).** Le lactonitrile est récupéré et purifié par distillation. Puis hydrolysé par l'acide Chlohydrique ou bien par l'acide sulfurique pour produire l'acide lactique. L'acide lactique est Ensuite estérifié avec du méthanol pour produire du lactate diméthyle, que l'on purifie par Distillation. Le lactate diméthyle est ré-hydrolysé par de l'eau dans une réaction acide Catalytique pour produire de l'acide lactique à nouveau ainsi que du méthanol (GHAFFAR, 2014**).**

Cette synthèse chimique produit un mélange racémique d'acide lactique D et (NARAYANAN N. R., 2004**),** La purification de l'acide lactique est réalisée par estérification avec du méthanol. La synthèse chimique d'acide lactique est moins utilisée à cause de ses effets néfastes sur l'environnement (NARAYANAN N. R., 2004**).**

4.3.2. Voie fermentaire

La synthèse de l'acide lactique par voie fermentaire permet de produire le stéréo-isomère d'acide lactique désiré grâce à l'utilisation de bactéries lactiques homofermentaires. Les microorganismes généralement utilisés pour la production d'acide lactique sont des bactéries homofermentaires ne produisant qu'un seul isomère optique D(-) ou L(+) de l'acide lactique. Les qualités recherchées chez ces bactéries sont la capacité de fermentation, la faible production de coproduits, la résistance à l'acide lactique et des besoins nutritionnels aussi faibles que possible (KOMESU, 2017).

Les souches pouvant se développer à faible pH et haute température sont particulièrement intéressantes, car dans ces conditions, les risques de contaminations sont

réduites. La mise en œuvre de ces microorganismes en fermenteur est souvent en mode discontinu ou continu.

Donc L'acide lactique peut être produit soit par synthèse chimique soit par fermentation Microbienne **Figure 7**.

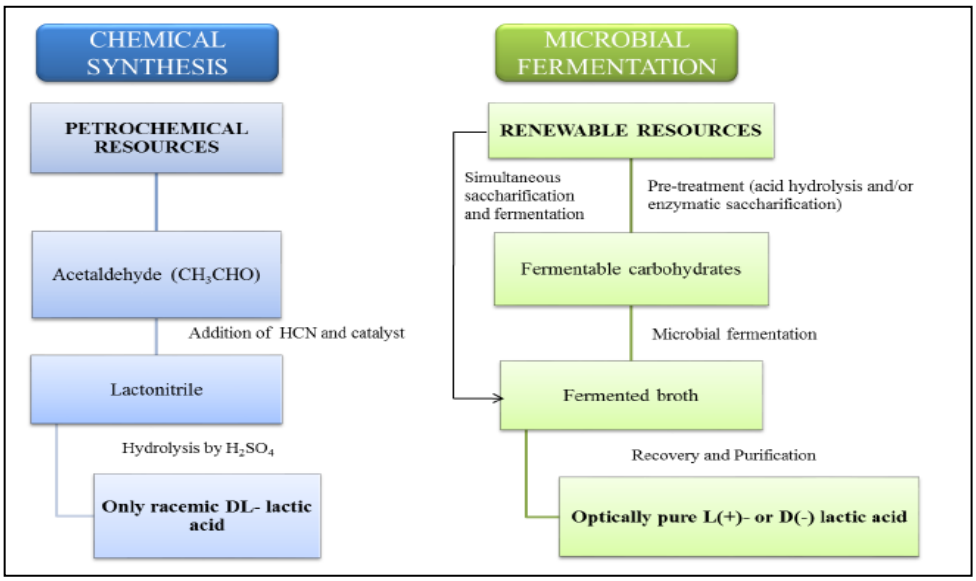


Figure 7 : Représentation schématique de deux processus de production d'acide lactique. (KOMESU, 2017).

4.4.Microorganismes producteurs d'acide lactique

L'acide lactique peut être produit par divers microorganismes tels que les bactéries, les champignons, et les levures.

4.4.1. Les bactéries

Les lactobacilles

Regroupe les espèces homofermentaires strictes *(Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus lactis, Lactobacillusacidophilus,* etc.) qui utilisent la voie d'Embden-Meyerhof pour convertir une molécule d'hexose en deux molécules de lactate. Ces bactéries possèdent une aldolase qui convertit le fructose-1,6 diphosphate en deux molécules de triose-3 phosphate. Elles sont incapables de fermenter les pentoses et les gluconate (manque de phosphocétolase), (Benhamada, 2020). Certaines de ces espèces sont d'une grande importance pour le fromage, le yaourt et les boissons probiotiques.

Les bacilles

Le groupe des bacilles thermophiles est très hétérogène, peu de souches sont capables de produire l'acide lactique en forte concentration (supérieur à 50 g/l), mais leur caractère thermophile est très attracteur pour une utilisation industrielle : limitation de problèmes de

contamination et des coûts de refroidissement; c'est le cas pour *Bacillus* coagulants (PAYOT T, 1999)**.**

Les lactocoques

Les *lactocoques* se présentent sous forme de coques en paires ou en chaînes de longueur variable. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives homofermentaires ne produisant que deL'acide lactique L (+), seul *Lactococcuslactisssp.*BiovarDiacetylactis produit le Diacétyle. Leur température optimale de croissance est proche de 30°C, capable à se développer à 10°C mais pas à 45°C. Quelques espèces produisent des exo polysaccharides et des bactériocines. Elles sont capables à se développer à 3% de bleu de méthylène et d'hydrolyser l'arginine. Elles se développent généralement à 4% de Na Cl et à un pH procheDe la neutralité, leur croissance s'arrêtant lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un Habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits. Actuellement, le genre*Lactococcus* comprend cinq espèces, *Lactococcuslactis*es l'espèce la plus connue avec ses trois sous-espèces : *Lc. lactisssp. Lactis, Lc. lactisssp. Crémoirs et Lc. lactisssp. Hordniae.* Selon **Guiraud (1998)**, le genre *Lactococcus* est représenté par les espèces suivantes : *Lc. lactisssp. cremoris, Lc. lactisssp. lactis et Lc. diacetilactis*. La sous espèce *Streptococcus Lactisssp. diacetylactis* est remplacée par la sous *espèce Lactococcuslactisssp*. Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (IKRAM, 2020)**.**

Lactococcuslactis est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus.

Culture mixte

Ce système n'est pas encore utilisé à l'échelle industrielle à cause des difficultés rencontrés au cours de l'optimisation des conditions de culture pour chaque souche, tels que le pH, la température, la demande en oxygène et la composition du milieu de culture. Plusieurs travaux ont été entrepris dans ce sens, Lactobacillus caseiet lactococcus lactis à patir du lactosérum, Aspergillus auror et Streptococcus lactis, Enterococcus cassee liflavuse tLactobacillus casei, Lactobacillus caseiet Lactobacillus delbruckii. Une culture mixte de Lactobacillus pentosuset de Lactobacillus brevisa été utilisée pour produire d'acide lactique à partir d'hémicellulose de paille de blé (GHAFFAR, 2014)**.**

D'autres utilisent les mutations génétiques Tableau 1.3 pour la production d'acide lactique. Les besoins nutritifs complexes des bactéries lactiques et l'inhibition de ces bactéries par la production d'acide lactique ont mené au développement des souches génétiquement modifiés de Escherichia coli capable de croître et de produire les deux

isomères d'acide lactique sur un milieu synthétique contenant les sucres, l'azote inorganique et les éléments minéraux (Tamine, 2019)**.**

4.4.2 Les champignons

Les souches des moisissures sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique (LITCHFIELD J. H., 1996). Sont Rhizopusarrhizus, Rhizopusdelmar, Rhizopusoryzae et Rhizopusstalmifer. Elles ont un métabolimehétérofermentaire et elles produisent de l'acide lactique L (+). Le genre rhisopus comme Rhizopusoryzae et Rhizopusarhizus possèdent des enzymes amylolytiques capables de transformer l'amidon en acide L(+) lactique (Wee, 2006)**.**

4.4.3 Les levures

Kluyveromyceslactis et Kluyveromycesmarxianus sont génétiquement modifiées pour produire l'acide L-lactique. Saccharomyces cerevisiae est génétiquement bien caractérisée, très utilisée industriellement, tolère le pH acide par rapport aux bactéries lactiques (GHAFFAR, 2014) **.** La levure *Pichiastipitis* génétiquement modifiée est également utilisée pour produire l'acide L-lactique à partir de xylose (ILMÉN, 2007)**, Tableau 1.3.**

Tableau 1.3 : Caractéristiques des microorganismes producteurs d'acide lactique (LITCHFIELD J. H., 2009)**.**

Microorganismes	Isomère d'acide	Type de Fermentation	Matières premières
Bactéries			
Bacillus sp.	L(+)	Homofermentaire	Bagasse de canne à sucre
Enterococcusfaecalis	L(+)	Homofermentaire	Mélasse de canne à sucre
Escherichia coli (génétiquement modifié)	L(+) ou D(-)	Homofermentaire	Glucose, saccharose, mélasses
Lactobacillus amylophilus	L(-)	Homofermentaire	Amidon
L. Amylovorus	Dl	Homofermentaire	Amidon
L. Casei. *Rhamnosus*	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, saccharose, mélasses
*L. Coyneformis*subsp. *Torquens*	D(-)	Homofermentaire	Enzyme-convertedcardboard
*L. Delbrueckii*subsp. *Bulgaricus*	D(-)	Homofermentaire	Petit lait de fromageand Permeate, lactose
L. Helveticus	Dl	Homofermentaire	Lactosérum, lactose

Lactococcuslactis	L(+)	Homofermentaire	Glucose, lactose
Champignons	L(+)		
Rhizopusarrhizus	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, xylose, amidon
R. Oryzae	/	Hétérofermentaire	Glucose, xylose, amidon
Levures (génétiquement modifié)	/	/	/
Kluyveromyceslactis	L(+)	Homofermentaire	Glucose
Saccharomyces cerevisiae	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose
Pichiastipitis	L(+)	Hétérofermentaire	Glucose, xylose

4.7. Applications de l'acide lactique

4.5.1. L'industrie des polymères

L'acide lactique peut être polymérisé en acide poly lactique à travers une série de réactions de polycondensation, de dépolymérisation et de polymérisation **Figure 8,** (XIAO, 2012).

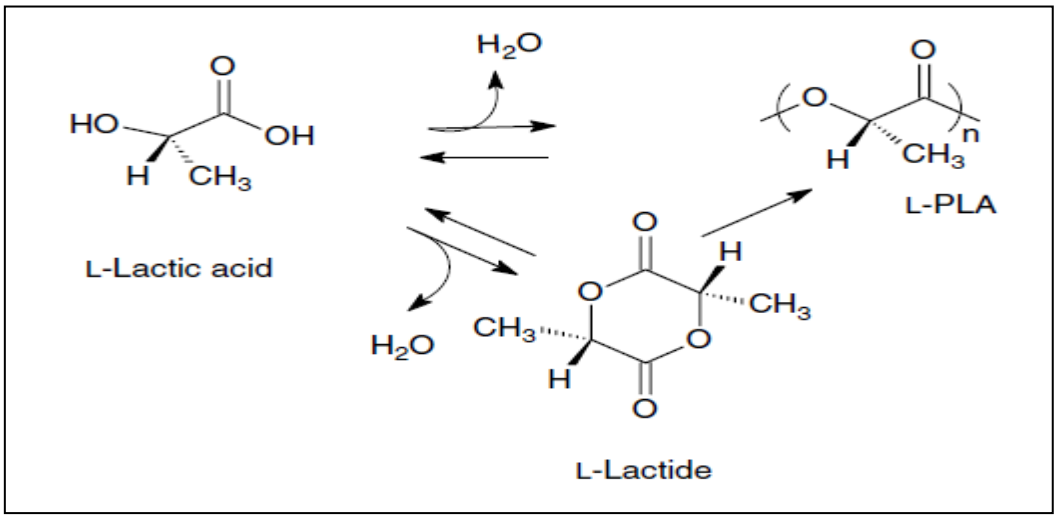


Figure 8. Les voies de polymérisation vers l'acide poly-lactique (HENTON, 2005)

4.7.2. L'industrie alimentaire

L'acide lactique peut être ajouté dans différents aliments transformés, habituellement pour l'ajustement du pH ou comme agent de conservation (un antioxydant ou bien pour le contrôle des microorganismes pathogènes) (NARAYANAN N. R., 2004).

Il peut également être utilisé comme un amplificateur de fermentation dans le seigle et le pain (BÖRGARDTS, 1998). Le lactate de potassium est utilisé dans différents produits à base de viandes fraiches ou cuites pour le contrôle de la durée de conservation, la conservation de la couleur et pour la réduction du contenu en sodium (REN, 2011)**.** Le lactate de sodium est utilisé comme un exhausteur de goût (REN, 2011)**.**

Le lactate est largement utilisé comme un agent antimicrobien pour réduire le nombre de bactéries pathogènes comme *E. coli, Salmonella p., Campylobactersp. et Listeria sp.* Dans la viande d'animaux comme le bœuf et la volaille au cours du processus d'abattage (REN, 2011)**.**

4.7.3. L'industrie cosmétique

En cosmétique, le lactate de sodium et de calcium sont utilisés pour leurs propriétés humectantes (VIJAYAKUMAR, 2008)**.** Les acyle-lactate sont connus pour leurs propriétés Émulsifiantes, épaississantes et stabilisantes (VIJAYAKUMAR, 2008)**.** L'acide lactique est utilisé dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux, réduire les effets de vieillissement et dans les dentifrices comme agent détartrant (NARAYANAN N. R., 2004)**.**

4.7.4. L'industrie pharmaceutique

L'acide lactique et l'éthyle lactate ont longtemps été utilisés dans des applications pharmaceutiques, particulièrement dans les lotions, les solutions parentérales, les solutions de dialyse et les solutions anti-acné (NARAYANAN N. R., 2004) (REN, 2011). Les polymères biodégradables possèdent des applications médicales comme les sutures chirurgicales (fils résorbables), les implants orthopédiques biodégradables, et la libération contrôlée de médicaments dans des fibres creuses, elles-mêmes biodégradables (VIJAYAKUMAR, 2008) (KOMESU, 2017)**.**

4.7.5. L'industrie chimique

L'acide lactique est considéré comme le potentiel monomère des conversions chimiques des matières premières car il contient deux groupes réactifs fonctionnels, le groupe carboxylique et le groupe hydroxyle (VIJAYAKUMAR, 2008)**.** L'acide lactique peut subir différentes conversions en produits chimiques potentiellement utiles, comme l'oxyde de propylène (via l'hydrogénation), l'acétaldéhyde (via la décarboxylation), l'acide acrylique (via la déshydratation), l'acide propénoïque (via la réduction), 2,3-pentanedione (via la

condensation) et le diacide (via l'auto-estérification). En chimie industrielle, l'acide lactique est utilisé dans la teinture des soies et autres produits textiles, comme mordant dans l'impression de lainages (VIJAYAKUMAR, 2008) (KOMESU, 2017)**.**

Dans l'industrie des plastiques, l'acide lactique est utilisé comme un agent de détartrage, un régulateur de pH, un neutralisateur, un solvant intermédiaire chirale, un agent de nettoyage, un agent antimicrobien et humectant, un agent des métaux complexes (REN, 2011)**.**

L'acide lactique naturel à une utilisation émergente comme un solvant excellent et sûr, Grace à son grand pouvoir de solvabilité et de solubilité, il constitue un excellent éliminateur de polymères et de résines (VIJAYAKUMAR, 2008)**.**

4.7.6. Autres utilisations

Les ester alkyl, comme l'éthyle et butyle lactate sont une bonne alternative aux éthers glycol et autres solvants grâce à leur faible toxicité (VIJAYAKUMAR, 2008) (NARAYANAN N. R., 2004)**.**

L'éthyle L(+) lactate est un remplaçant avantageux de certains solvants toxiques pour le nettoyage de métaux de précision pour l'électronique, l'aérospatiale et les industries des semi-conducteurs (VIJAYAKUMAR, 2008)**.**

4.8. Les matières premières utilisées pour la production d'acide lactique

L'un des principaux défis dans la production d'acide lactique à grande échelle est le coût de la matière première. Par conséquent, l'utilisation de matières premières moins couteuses est requise pour rendre le procédé industriellement rentable. Les caractéristiques souhaitées pour les matières premières sont un prix relativement bas, de faibles niveaux de contaminants, des taux de production rapides, des rendements de production élevés, une réduction de la formation de sous-produits et une bonne capacité à être fermentées sans prétraitements lourds (Wee, 2006)**.**

Plusieurs procédés de production d'acide lactique utilisant des matières premières peu coûteuses ont été largement étudiés.

Partie Expérimental

1. Matériel et Méthodes

1. Lieu et période de travail

Notre étude a été réalisée dans une période allant de mois de février 2022 jusqu'à mai 2022. Les souches microbiennes ont été fournies par le laboratoire Sacco, Food Mania, cité Kourifa el Harrach Alger.

Tandis que toutes les manipulations ont été effectuées au niveau de laboratoire de la faculté de sciences de la nature et de la vie (SNV) et le hall technologiques de l'université Yahia Farès de Médéa.

2. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude consiste en :

- La valorisation d'un sous-produit alimentaire, (lactosérum) à pouvoir polluant assez important.
- L'optimisation des paramètres physicochimiques (température et temps de fermentation) pour produire de l'acide lactique par différentes bactéries lactiques sur lactosérum doux déproteiné et stérilisé.

3-Matériel

3-1 Verrerie, appareils et produits chimiques

Les verreries, les appareils ainsi que les produits chimiques utilisés dans notre travail sont Présentés dans le tableau (**annexe01**).

3-2 Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé au cours de notre fermentation est à base de lactosérum doux issu de la fabrication de fromage à pâte cuite **"Camembert"** provenant de la **laiterie président BniTamou (Blida).** Avant son utilisation comme substrat de fermentation, ce lactosérum est déprotéiné selon le protocole proposé par (BOUDJEMA K. F.-N., 2009)**.**

L'utilisation de lactosérum doux déproteiné comme substrat de fermentation lactique nécessite au préalable une étude biochimiquedétaillée (BENBEGUARA, 2003), La connaissance de cettecomposition est nécessaire pour procéder par la suite à des essais de supplémentassions afin d'obtenir un milieu de culture adéquat, le **tableau 04** montre la composition des différents types de lactosérum (BOUDJEMA K. F.-N., 2009) **et** (SOTTIEZ, 1990) **.**

Tableau 04 : Composition moyenne du lactosérum de l'ORLAC de président Beni-Tamou (Blida).

	Lactosérum brut (avant stérilisation et filtration)	Lactosérum traité (filtré et stérilisé)
pH	6,00- 6,30	5,90- 6,20
Composition en g/l		
Extrait sec	79	70
Taux des cendres	7,98	7,96
Chlorures	1,80	1,75
Matière grasse	1,00	0
Teneur en azote total	1,61	1,12
Teneur en protéines	10,06	7
Teneur en lactose	61	57.9

3-3 Bactéries lactiques

Les souches utilisées **(tableau05)** dans notre étude sont des souches homolactiques prevenant de la collection du laboratoire SaccoFood Mania, El- Harrach Alger**(annexe 02).**
Les caractéristiques des différentes souches sont présentées dans le tableau

Tableau 05 : Description des souches utilisées pour la Fermentation.

Références	Souches	Caractéristiques
LYOFAST MW 039 S	*Lactococcuslactisssp* Mésophile	composé d'un mélange spécialement sélectionné de *Lactococcuslactissspcremoris* (sous forme de poudre) est emballé dans des sacs en aluminium à l'éprouve de L'eau et l'air. Utilisé pour la fabrication de fromages type camembert

CRYOFAST MO 040 CR	*LactococcusLactis*sssp Thermophile	bactérie lactique homofermentaire, température optimale de croissance 22-34°C et pH=4,3.0 utilisée comme levains laitiers pour la fabrication des fromages (sous forme de poudre).
YOFLEX MILD 1.0	*Streptococcus Thermophilus*et *Lactobacillus bulgaricus*	streptococcus thermophiles est une Bactérie alimentaire thermophile (optimum de croissance à 42 °C), présente dans la fermentation du lait, ou elle est notamment utilisée en association avec *Lactobacillus bulgaricus.*

4-Méthodes analytiques

4-1 Revivification des souches

Les souches lyophilisé es sont activées par incubation dans un bouillon nutritif à 30°C pendant 24h(**Figure09)(annexe 03).**Puis chaque souche est ensemencée dans des tubes dits tubes de conservation contenant de gélose nutritif incliné et des boites de pétri puis incubées à différentes températures.

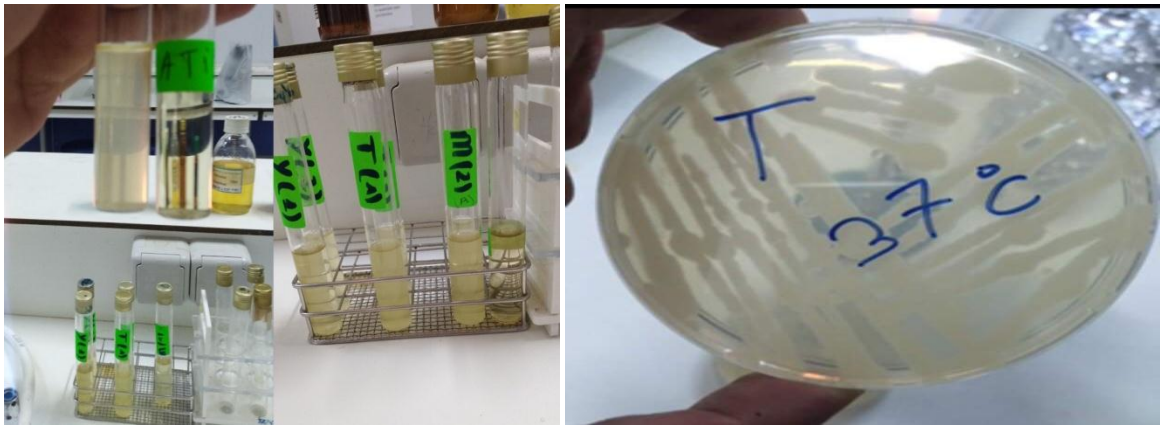


Figure 09 : réactivation des souches bactériennes

4-2 Préparation de l'inoculum

A partir des boites incubées et à l'aide d'une anse de platine stérile, on gratte légèrement la surface de la gélose (Gélose nutritive) afin de mettre en suspension les bactéries. Ensuite, la suspension est ajustée au standard Mc Farland de 5 à l'aide d'un spectrophotomètre UV Visible, ce qui correspond à une densité optique de 0,9 **(Figure 10 et tableau 06).**

Tableau 06 : Standard de Mc Farland

Mc Farland Standard No.	0.5	1	2	3	4	5
Approx. cell density (1X10^8 CFU/mL	1.5	3	6	9	12	15
Absorbance*	0.08-0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	0.9

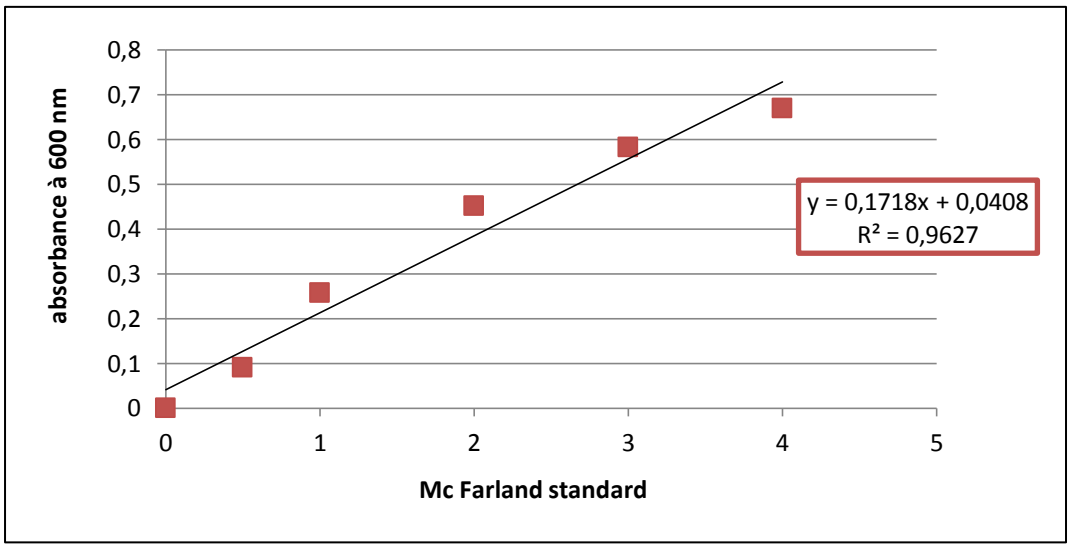


Figure 10 : courbe d'absorbance de différents Mc Farland à 600 nm.

5-Collection et préparation de milieu de culture

Le pH de lactosérum est ajusté à une valeur de 4,6 (point isoélectrique des caséines) par addition d'acide sulfurique (1N) **Annexes 04**, puis autoclaver pendant 5 minutes à 102°C. Après refroidissement, il est filtré sur un filtre (type Wattman) et centrifugé à 5000rpm pendant 15 min. L'opération est répété plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un sérum limpide, le filtrat recueilli est réajusté à pH=6,4 par Noah (1N) **Annexes 05**, puis stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Les étapes dans la **figure11**suivantes

:

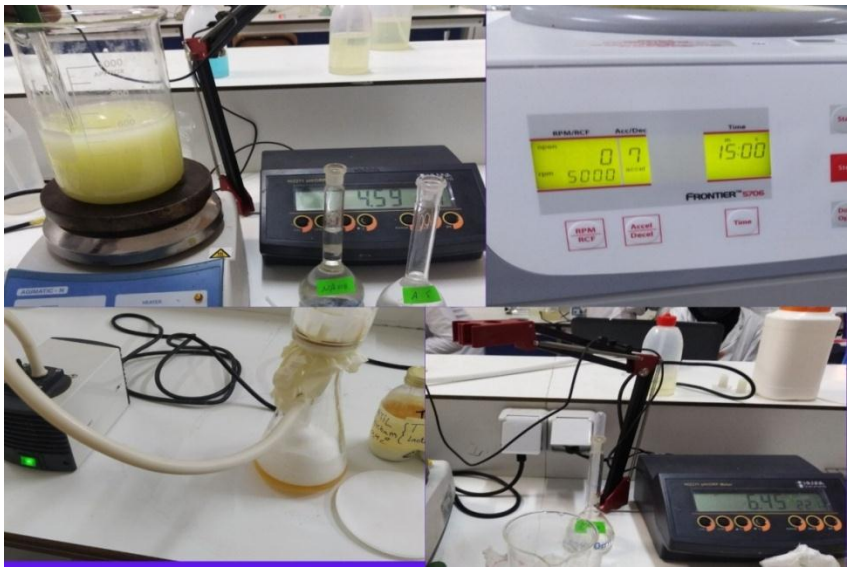


Figure 11 : Les étapes de préparation de milieux de culture.

6-Inoculation de milieu de culture

Les fermentations en discontinu (batch) à pH ajusté est réalisée dans des Erlenmeyers d'une capacité de 500 ml qui contenant 300 ml du milieu de culture en absence d'agitation et d'aération (**Figure 12).**Après stabilisation de la température, le milieu de culture est ensemencé par 30 ml du milieu de préculture. Les Erlenmeyers sont ensuite incubés dans des étuves à des températures différentes selon la souche.

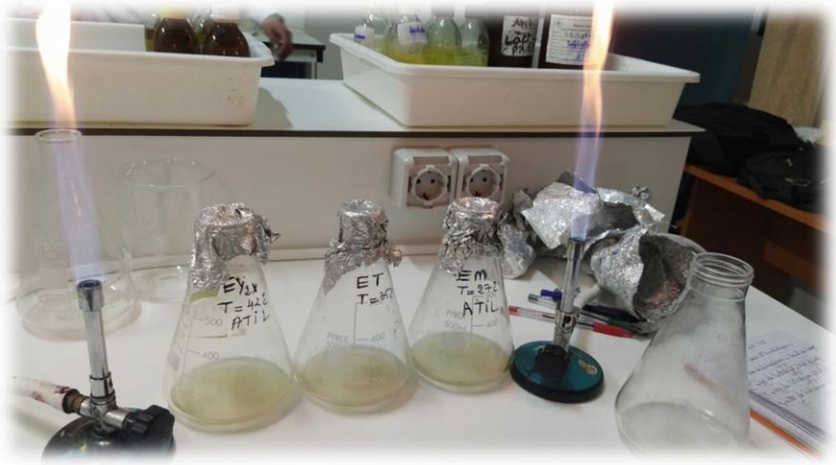


Figure 12: préparation des Erlenmeyers pour la fermentation.

7-Condition de fermentation

Dans ce travail toutes les expériences réalisées ont été planifiées en utilisant la méthode des plans d'expériences. Dans le but de produire de l'acide lactique et l'étude des facteurs qui influencent cette production ainsi que la détermination des conditions optimales (Températures et temps**) Tableau07.**

Tableau 07: les différentes températures et temps de fermentation pour chaque expérience.

EXP N°	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Souches	Mx	My	Tx	Ty	Yx	Yy
Température de fermentation	27	31	35	39	42	46
Le temps d'incubation	à 24,48 et 72 h					

(Mx, My):*lactococcus lactis ssp cremoris mésophile.*

(Tx, Ty): *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile.*

(Yx, Yy): *Streptococcus thermophiluse et lactobacillus belgaricus.*

8- Schéma des fermentations

Streptococcus Thermophiluse → EXP N°1 a T 42c° → **inoculum (Yx)**

et lactobacillus belgaricus → EXP N°2 a T 46 c° → **inoculum (Yy)**

lactococcus lactisssp cremoris → EXP N°3 a T 27 c° → **inoculum (Mx)**

Mésophile → EXP N°4 a T 31 c° → **inoculum (My)**

lactococcus lactis ssp cremoris → EXP N°3 a T 35 c° → **inoculum (Tx)**

Thermophile → EXP N°3 a T 39 c° → **inoculum (Ty)**

9- Mesure de pH

Le pH est déterminé à l'aide du pH mètre (mesuré à chaque temps d'incubation 24, 48,72h) **figure13.**



Figure 13: mesure de pH pour chaque Erlenmeyers.

10- Mesure de l'acidité

L'acidité tritrable des échantillons de 10 ml a été mesurée par titration à l'aide de NaOH1(N) **Annexe05,** jusqu'à ce que le pH atteigne 8.6 (**Figure14).**L'acidité est exprimée en équivalent acide lactique (g/l) (BOUDJEMA K. F.-N., 2009).

L'équation de mesure de la concentration d'acide lactique :

$$[AL] = \frac{VNaoH \cdot PMAL}{Véq} [NaOH]$$

Avec :

[AL] : concentration de l'acide lactique en (g/l)

[NaOH] : concentration de NaOH en (g/l).

PM_{AL} : poids moléculaire d'acide lactique 90 g/mole

$V_{éq}$: Volume de l'échantillon 10ml.

V_{NaOH}: Volume de dosage en (ml).



Figure 14 : dosage de l'acide avec NaOH.

11- Dosage de lactose

La concentration de lactose dans le milieu de culture est déterminée par la méthode de Bradford 1980, (HALASSI, 2022)**.**

Principe : basée sur une défécation de lactosérum, oxydation de lactose etlavage du précipité de Cu_2O, réoxydation de Cu_2O et dosage de sel ferreux formé puis titration par KMnO4 (0.1N)**(annex7)**.

La densité optique de biomasse (DO) est déterminée par spectrophotomètre UV-VIS à une longueur d'onde égale 600 nm sachant que :

DO_{600} =Y. PS

PS:poids sec.

Y : facteur égale 1.01285.

Le poids sec de biomasse est obtenu après centrifugation de 20 ml de lactosérum, le culot ainsi récupéré est lavé avec de l'eau distillée puis séché à105 °C (BOUDJEMA K. F.-N., 2009).

12-Précipitation de l'acide lactique

La cristallisation de l'acide lactique sous la forme de lactate de calcium peut être envisagée en tenant compte des impératifs économiques et techniques des industriels (BOUDJEMA K. F.-N., 2009), Pratiquement tout l'acide lactique est sous la forme de calcium lactate selon l'équation suivante:

$$C_3H_6O_3 + Ca(OH)_2 \rightarrow CH_3CHOHCOO\text{-}Ca^{2+} + 2H_2O$$

Acide lactique *hydroxyde calcium* *Lactate de calcium*

Les étapes de la précipitation sont les suivantes :

- A la fin de la fermentation une centrifugation à 5000 r.p.m pendant 15 min a été effectuée

La précipitation du lactate de calcium se fait à l'aide de l'hydroxyde de calcium en ajoutant0.5 g d'hydroxyde de calcium pour 1g/l d'acide lactique. Puis on a procédé à une Agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Ainsi, le mélange a été conservé à 4°C pendant une nuit. En fin, le mélange a été filtré à travers un papier Wattman**Figure15**,séché puis pesé afin de déterminer la quantité obtenue.

-Après filtration, séchage on a récupéré le lactate de calcium et analyser par spectroscopie Infrarouge**Figure16.**



Figure15 : filtration sous vide de mélange hydroxyde de calcium-acide lactique



Figure 16: L'appareille spectroscopie Infrarouge d'analyse de précipité finale après séchage.

13-Analyse par Spectrophotométrie infrarouge :

Principe

Le principe de cette spectroscopie est tous a fait semblable à celui de la spectrophotométrie UV-visible.

L'examen des radiations absorbées par l'échantillon permet d'identifier les transitions entre niveaux d'énergies et d'en déduire des informations sur la structure de la molécule.

En UV-Visible, les radiations absorbées correspondent à des transitions entre niveaux d'énergies électroniques.

Dans l'infrarouge, les énergies mises en jeu sont principalement des énergies de vibration (IR proche).

Domaine d'application

Il existe plusieurs grands champs d'application pour la spectrophotométrie IR

On peut citer :

- L'analyse fonctionnelle.
- L'analyse structurale.
- L'analyse qualitative et quantitative.
- Contrôle de réaction en synthèse.

Technique de préparation pour analyser le précipiter

- **Préparation de la Pastille de KBr :**

Peser 300mg de KBr (pour spectroscopie **annexe 6**) pulvériser 1 à 3mg de lactate de calcium avec environ de 30mg de KBr dans un mortier en agate. Et broyer jusqu'à ce que tout soit homogène, ajouter ensuite le reste du KBr et bien mélangé. Remplir le moule de poudre, placer le piston et le tourner quelque fois pour que la poudre soit bien répartie. Avent le pressage, évacuer le moule sous vide (élimination de bulle d'air) puis presser à haute pression. Arrêter le vide, aérer le moule, lâcher la pression et sortir la pastille du moule. Pour la mesure, attacher la pastille a la fixation et la mettre sur le dispositif de fixation prévu à cet effet **Figure17**, répéter cette préparation pour tous les échantillons a analysée.

La pastille doit être relativement transparente. Les pastilles opaques sont cassées, broyées et pressées à nouveau.

Après quelque clique sur logicielle en établir le spectre IR de substances qu'on vous indiquera au laboratoire et en passe pour interpréter qualitativement les spectres obtenus **annexe 7**.

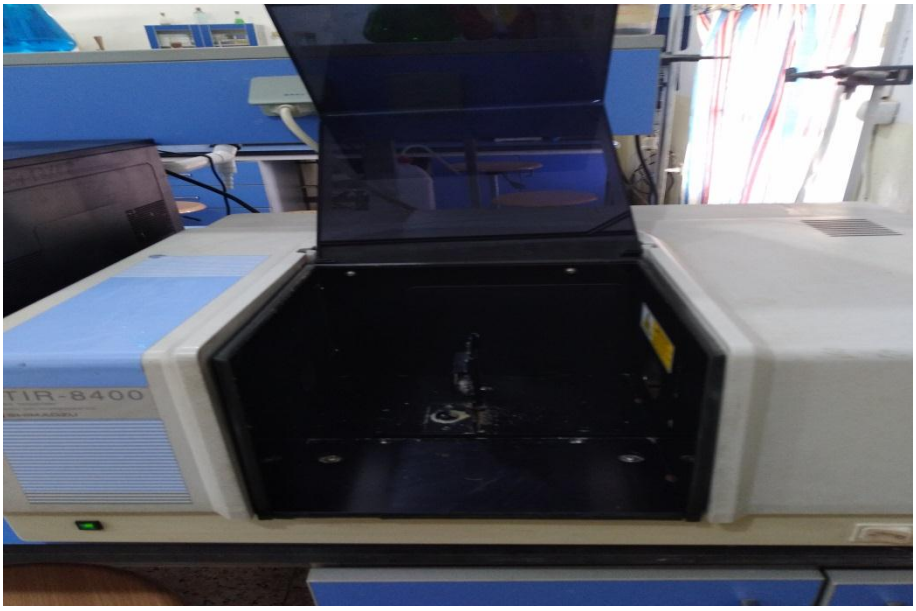


Figure17 : Dispositif de fixation d'échantillons a analysée par infrarouge.

II. Résultats Et Discussion

1. Composition physicochimique du lactosérum

La composition biochimique du lactosérum issu de l'ORLAC président BniTamou (Blida).Est représentée sur le **tableau 08**. La connaissance de cette composition est nécessaire pour procéder à des essais de fermentation afin d'obtenir un milieu adéquat et pris pour la fermentation.

Tableau08 : composition de différents types de lactosérum selon (BOUDJEMA K. F.-N., 2009) **et** (SOTTIEZ, 1990) **.**

	Lactosérum doux			Lactosérum acide		Lactosérum déprotéiné perméat doux d'ultrafiltration
	Pâte pressée cuite (Emmental)	Pâte pressée non cuite (Edam)	camembert	Pâte fraîche	Caséine	
Liquide (%)	93,5	95	5,00	94	94	-
extrait sec en %	6,5	6,50	93,5	6,00	6,00	4,50
pH	6,70	6,50	6,10	6,00	4,60	6,40
Composition en g/l						
Lactose	76,00	75,00	75,00	65,5	74,00	85,00
Protéines	13,50	13,50	12,00	12,00	12,00	4,00
Cendres	8,00	8,00	8,25	9,00	12,00	9,00
Acide lactique	1,80	2,80	2,20	10,00	1,80	2,00
Matière grasse	1,00	1,00	1,00	0,50	0,50	0,00
Matière minérale						
Ca en %	0,60	0,65	0,70	1,90	1,80	0,60
P en %	0,60	0,65	0,70	1,50	1,50	0,60
Chlorure (NaCl)	2,50	2,50	2,50	2,50	7,50	2,80

La composition biochimique moyenne du lactosérum doux (brute et traité) provenant de l'ORLAC président BniTamou semble être inférieure à celle enregistrée par (SOTTIEZ, 1990) **(voir tableau04)** dans le cas du lactosérum de fromage à pâte cuite. Toutefois, les valeurs sont légèrement inférieures ce peut être expliqué par une différence de la composition initiale du lait utilisé.

Comme montre le **tableau 08**, le lactose est le constituant le plus important du lactosérum, il représente 70 à72% de l'extrait sec (BENBEGUARA, 2003)**.**

Lors du traitement du lactosérum, nous avons constaté qu'il y a une variation du pH, il est de 6,3 à l'état brut et il peut atteindre 5,9 après son traitement.

Cette acidification est attribuée à une dégradation du lactose qui chute de 61 g/L à 57.9 g/L.

Selon (AMRANE, 1997)une quantité de 47 g/L de lactose est largement suffisante pour la production d'acide lactique.

En revanche, lors de la déproteinisation du lactosérum, on a constaté une perte de 3,06 g/L de protéines.

De manière générale ce lactosérum est jugé un bon milieu pour les expériences de fermentation.

2- Résultats de l'évolution de pH au cours de la fermentation

Les résultats de toutes les expériences réalisées ont été planifiés en utilisant la méthode des plans d'expériences. Dans le but de produire l'acide lactique et l'étude des facteurs qui influencent cette production ainsi que la détermination des conditions optimales. (Températures et temps**),** Les résultats dans le **tableau09**.

Tableau 09 : évolution du ph pour chaque expérience.

EXP N°	La souche	Tc°	pH_I	Ph_{24h}	Ph_{48h}	Ph_{72h}
1	Mx	27	5.47	4.22	4.20	4.19
2	My	31	5.84	4.40	4.25	4.27
3	Tx	35	5.77	4.50	4.49	4.49
4	Ty	39	5.78	4.54	4.25	4.21
5	Yx	42	5.37	4.11	4.04	4.03
6	Yy	46	5.80	4.12	4.41	4.20

Les résultats de l'évolution du pH du milieu de culture au cours de la fermentation dans des différentes températures nous ont permis de tracer les graphes présentés dans la **figure 18:**

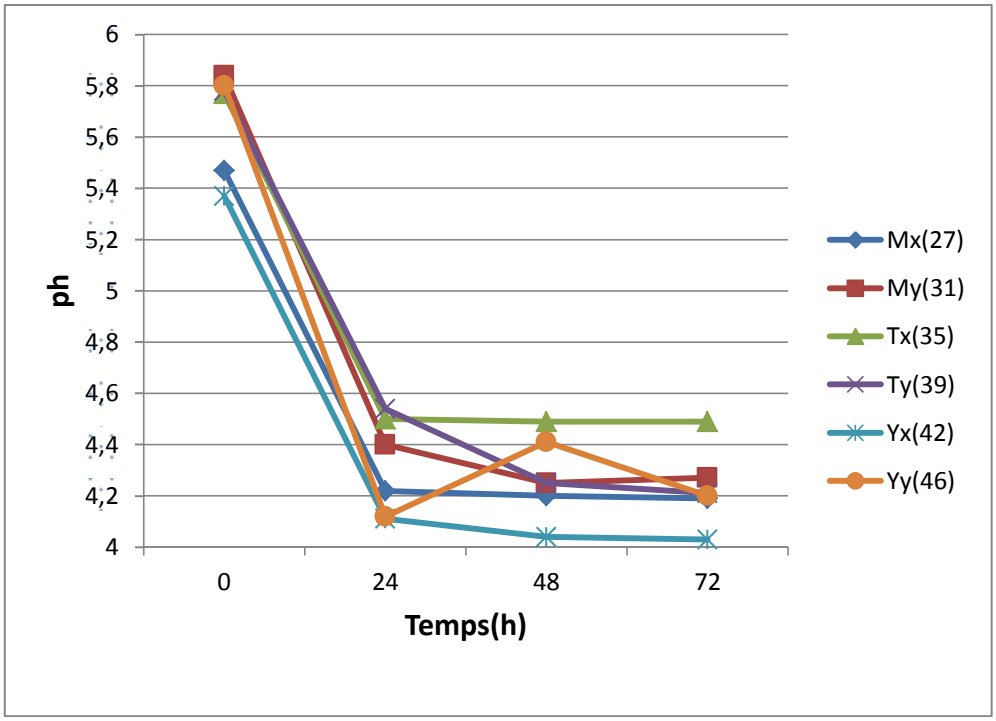


Figure 18:l'évolution du ph pour chaque expérience à des températures constants et temps différentes.

La figure montre l'évolution du ph pour chaque expérience à des températures constants et temps Différentes.

Toute les expériences montre une diminution de ph initiale qui juge le bon déroule de fermentation est la fiabilité des expériences en première temps.

Durant les cis (6) fermentations, le pH diminue **(figure18).** Par exemple, à T = 42°C et au bout de vent heures, il passe de 5.35 à 4.20 et il arrive à 4.01 à la fin de la fermentation.

Selon (TERRE, 1986) , Streptococcus thermophiles acidifie le lait plus rapidement.

En plus, les résultats de (CHAMBA, 1989) montré qu'une souche n'est acidifiante que si la diminution de pH égale au moins 0.5 unité en vent heures pour les Streptococcus thermophilus.

Selon (BOUDJEMA K. F.-N., 2009)le pH diminue rapidement Par exemple,
A' T = 42°C et au bout de quatre heures, il passe de 6.09 à 5.22 et il arrive à 4.33 à la fin de leur fermentation.

A cet égard, on peut considérer nos souches comme acidifiantes.

3- Résultats de test d'acidification

Le critère ΔpH correspond à l'écart de pH entre le temps initial et la fin de la fermentation : $\boldsymbol{\Delta pH = pHi - pHf}$.

Ou : $\boldsymbol{pHi}$: pH initial du milieu

$\boldsymbol{pHf}$: PH final à la fin de la fermentation

Ce dernier permet de déterminer le pouvoir d'acidification globale de la souche. Les valeurs de ΔpH_{max} des différentes expériences sont montrées dans le **Tableau10.**

Tableau 10 : Pouvoir d'acidification globale des souches.

EXP N°	La souche	T°C	ΔpH_{max}
1	Mx	27	1.28
2	My	31	1.57
3	Tx	35	0.98
4	Ty	39	1.60
5	Yx	42	1.34
6	Yy	46	1.51

D'après les résultats illustrés par ce tableau on a tracé Histogramme présentés dans **Figure 19**

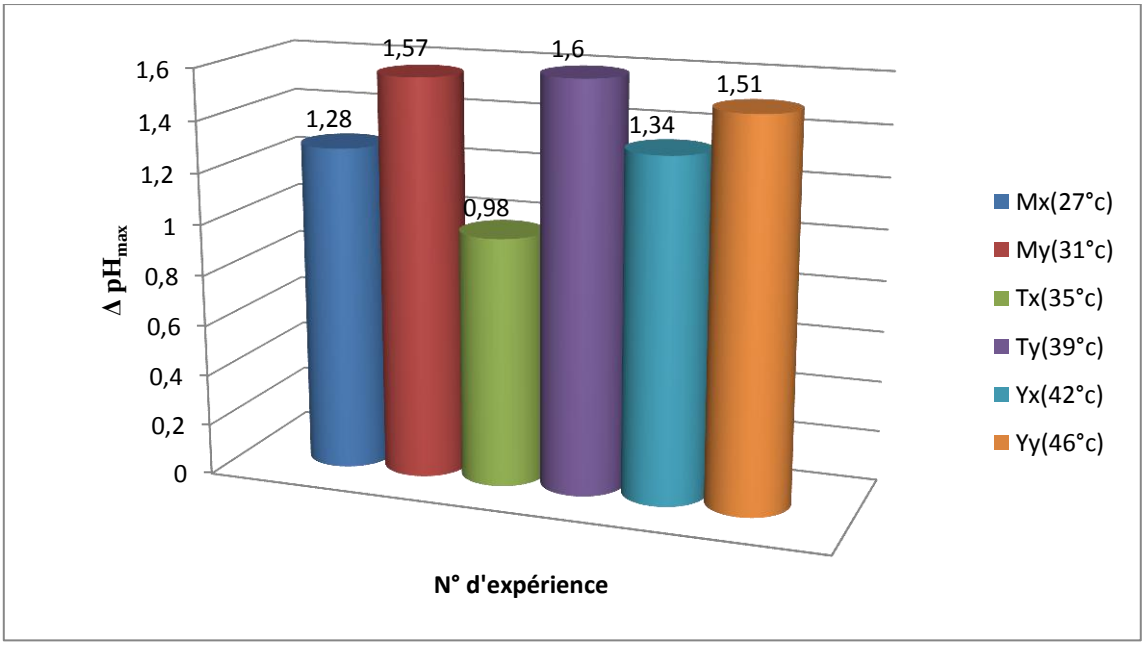


Figure 19 :l'évolution de la Pouvoir d'acidification globale des souches pour chaque expérience à des températures constantes et temps différentes.

On constate que l'expérience n° 4 possède un pouvoir d'acidification plus que les autres ce qui montre que la souche *Lactococcus lactis ssp cremoris thermophile* produire une quantité d'acide lactique plus élevée. De ce fait, nous avons opté pour cette souche dans la suite de notre expérimentation.

4- Résultats de mesure de l'acidité

le Les résultats de titration à l'aide de NaOH 1(N) d'acide lactique pour chaque expérience sont présentés dans le (**Tableau 11).**

L'acidité est exprimée en équivalent acide lactique (g/l) (BOUDJEMA K. F.-N., 2009)**.**

Tableau 11 : concentration de l'acide lactique en (g/l) pour chaque expérience après 72h.

EXP N°	La souche	T°C	[AL] g/l
1	Mx	27	4.56
2	My	31	4.44
3	Tx	35	4.23
4	Ty	39	5.66
5	Yx	42	4.32
6	Yy	46	3.01

[AL] : concentration en acide lactique.

Les résultats des concentrations d'acide lactique aux fins de la fermentation dans des différentes températures nous ont permis de tracer le histogramme présentés dans la **figure20**

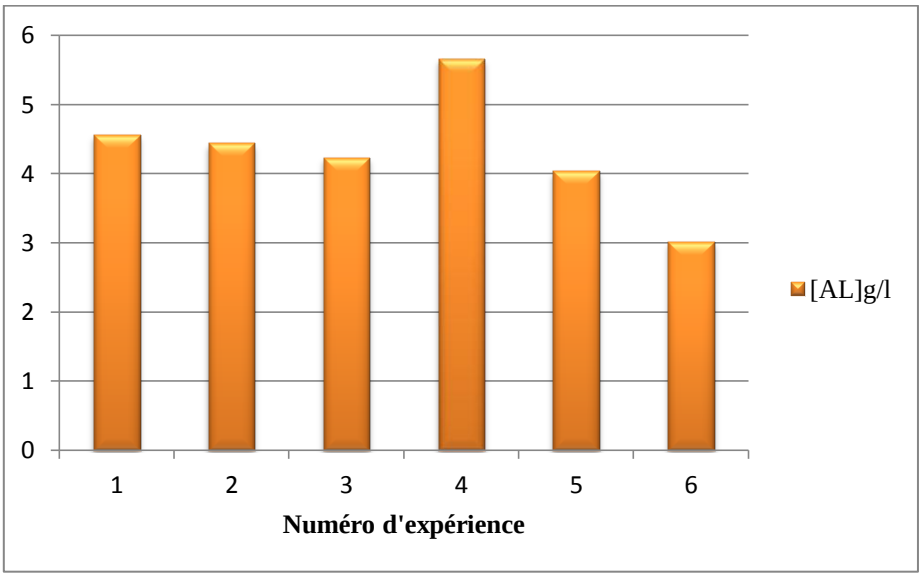


Figure 20 : Représentation graphique de la concentration d'acide lactique selon les expériences.

La représentation graphique montre que l'expérience n°4 possède la concentration maximale d'acide lactique et de 5.66g/l au bout de 72h ce qui confirme les résultats de test d'acidification.

5- Criblage des souches productrices d'acide lactique

Le criblage de la bactérie lactique, parmi les trois souches, qui produit la quantité maximale d'acide lactique a été réalisé en utilisant le même milieu de culture et les mêmes conditions physico-chimiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Les quantités maximale d'acide lactique produit par les souches cultivées sur le Même milieu de culture

souche	Température °c	[acide lactique] (g/l)
Streptococcus thermophiluse et lactobacillus belgaricus	42	4.32
Lactococcuslactissspcremoris mésophile	27	4.56
Lactococcuslactissspcremoris thermophile	39	5.66

D'après ces résultats on peut remarquer que la plus grande concentration en acide lactique est obtenue dans les conditions de l'expérience N°4 à 39°c et au bous de 72h par la souche *Lactococcuslactissspcremoris thermophile*.

Les deux autres souches donnent des concentrations de 4.32et 4.56 g/l à des températures 42 et 27 °c successivement

Le **tableau 12**montre que la souche *lactococcuslactissspcremoris*thermophile possède une bonne aptitude à produire de l'acide lactique dont la concentration est de l'ordre de 5.66g/lsur 300ml de milieu à base de lactosérum à 39 °C.

Cette souche est choisie pour continuer notre travail qui porte sur la production de l'acide lactique par les bactéries lactique.

6-Etude cinétique de la fermentation lactique

En se basant sur les résultats obtenus dans le **tableau 11** on a choisi l'expérience N°4 **Tableau13** qui a donné la plus grande concentration en acide lactique pour réaliser une étude cinétique qui nous a permis de suivre l'évolution du pH, la concentration en acide lactique en fonction du temps.

Tableau13 : Les conditions de culture choisies.

EXP N°	La souche	T°C	pH_I	Temps
4	Ty	39	5.78	72h

7-Pouvoir d'acidification globale de la souche choisie

Les résultats de l'évolution du pH du milieu de culture au cours de la fermentation *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile***,** nous ont permis de tracer le graphe présenté dans **la figure 21**

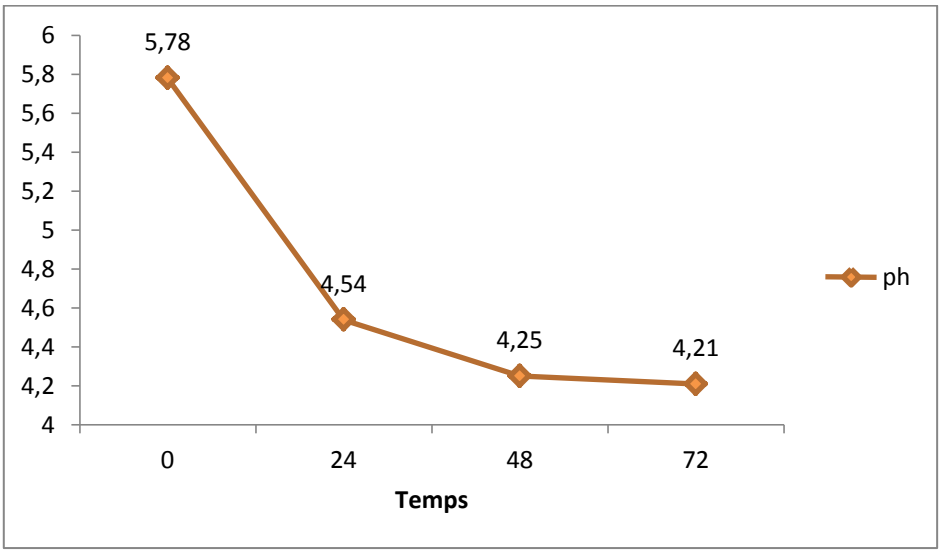


Figure 21 : Evolution du pH au cours de la fermentation discontinue par *lactococcus lactis ssp cremoris*.

La **figure 21**, montre que le pH diminue lentement et tourne autour d'une valeur de 5 pendant 24h ensuite il diminue rapidement pour atteindre un pH de 4.21 au bout de 72h, avec un pouvoir d'acidification ΔpH globale de la souche *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile*de l'ordre de 1.60

Selon la certification (**annexe 03),** la fermentation chez les *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile* est stoppée lorsque le pH atteint la valeur de 4.3.

8-Evolution de production de l'acide lactique

Les résultats de l'évolution de la concentration d'acide lactique produits par *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile* et la concentration des sucres totaux sont présentés dans la **figure 22.**

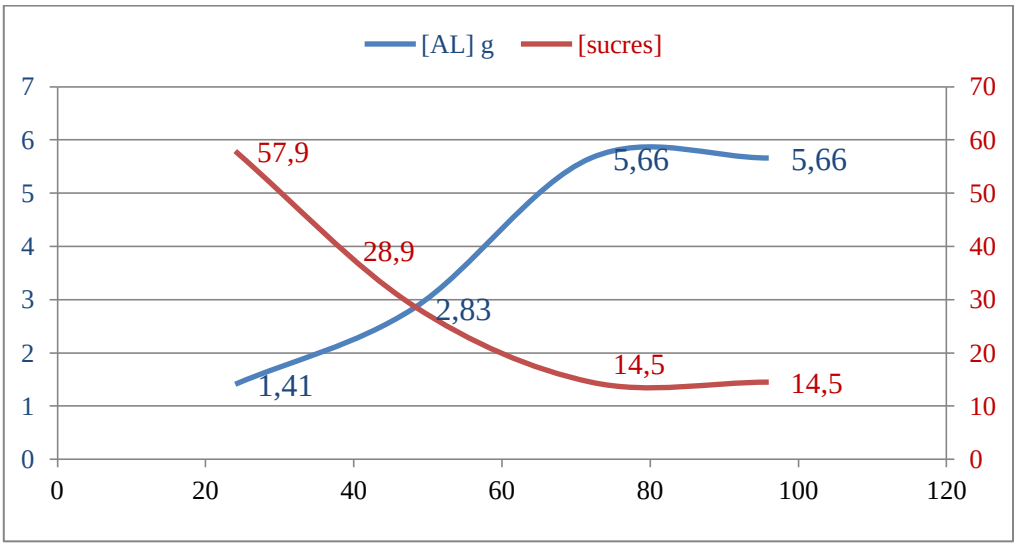


Figure 22: Evolution de la concentration des sucres totaux et la concentration d'acide lactique, en fonction du temps.

La **figure22** montre que la production d'acide lactique a connu une évolution en continu et n'a pas cessé d'augmenter jusqu'à 72h ou elle est ralentie et devient stationnaire à partir de 75h jusqu'à la fin de la fermentation. La concentration finale de l'acide lactique est de 5.66 g/l sur le milieu à base de lactosérum.

La **figure 22** a bien illustré la dégradation de lactose par un simple graphe décroissant. La chute de 57.9g/l à 14.5g/l veut dire que le lactose est consommé par la bactérie et converti par la suite en un produit fini (acide lactique)**(figure 22).**

D'après (TAMINE, 2019), les résultats obtenus avec *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 19435 ont montré que le jus de fruit d'*Opuntia ficus indica* est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique.

La concentration optimale des sucres totaux du jus de fruit est de 80 g/l avec une production maximale d'acide lactique de 12,87 g/l.

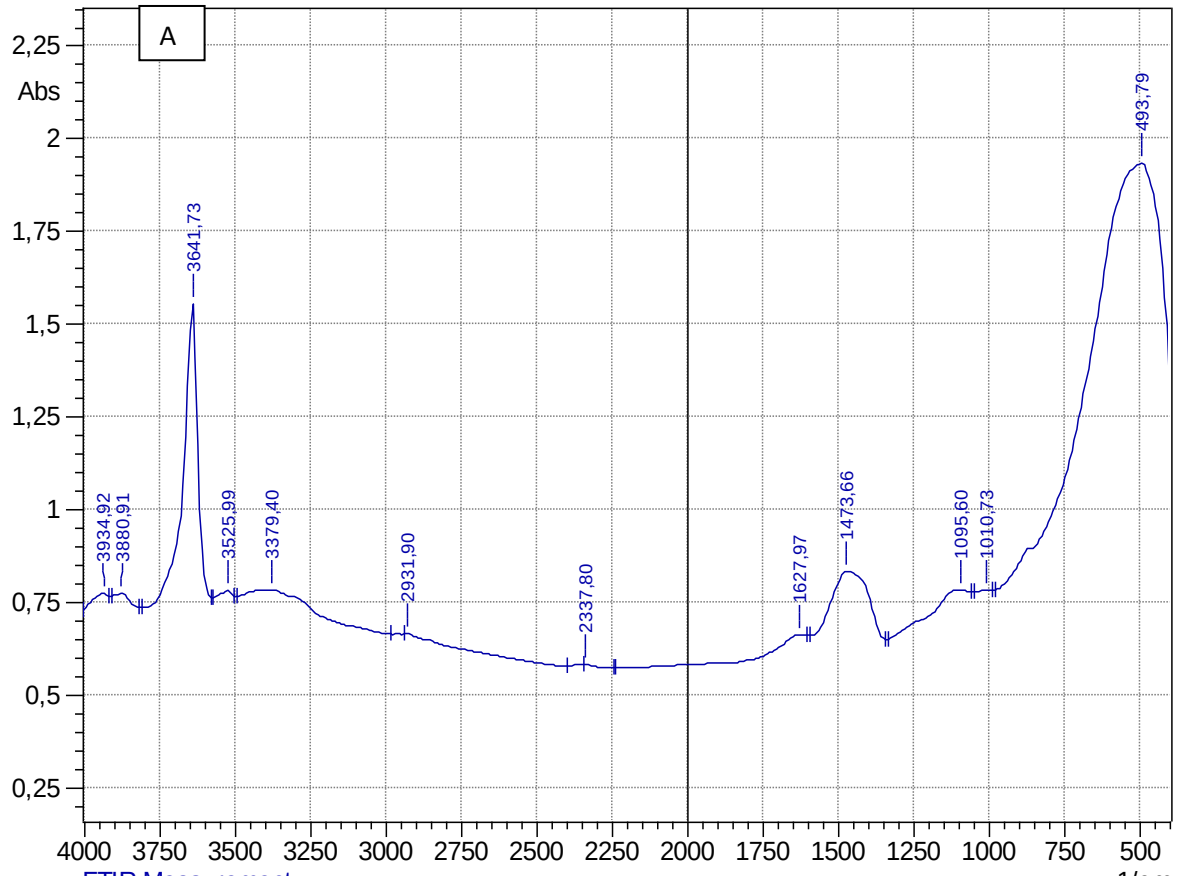
L'enrichissement du milieu à base de jus de fruit en sels minéraux et en extrait de levure a permis d'améliorer la production d'acide lactique de 53,8%, soit une concentration maximale de 19,8 g/l.

Dans le cas de la souche de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (Lc 20) isolée à partir de lait de chamelle sur jus de fruit d'*Opuntia ficus indica,* la concentration maximale en acide lactique produite est de 10,10 g/l.

L'ajout des sels minéraux au milieu de culture a permis une amélioration de la production d'acide lactique de 17,42%, soit une concentration de 11,86 g/l.

9-Précipitation de lactate de calcium par hydroxyde de calcium

La précipitation de l'acide lactique produite par la souche *lactococcus lactis ssp cremoris thermophile* a été réalisée dans notre travail en utilisant l'hydroxyde de calcium. L'analyse par spectroscopie infrarouge nous a permis d'obtenir les spectres présentés dans la **figure23.**



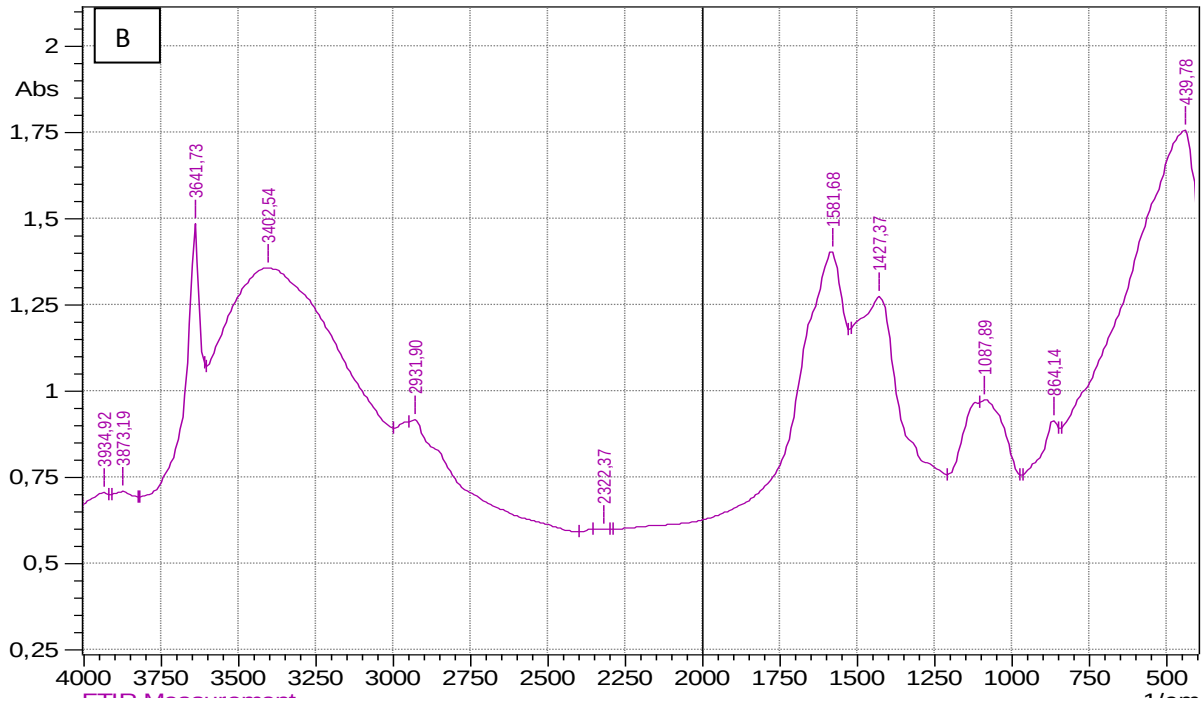
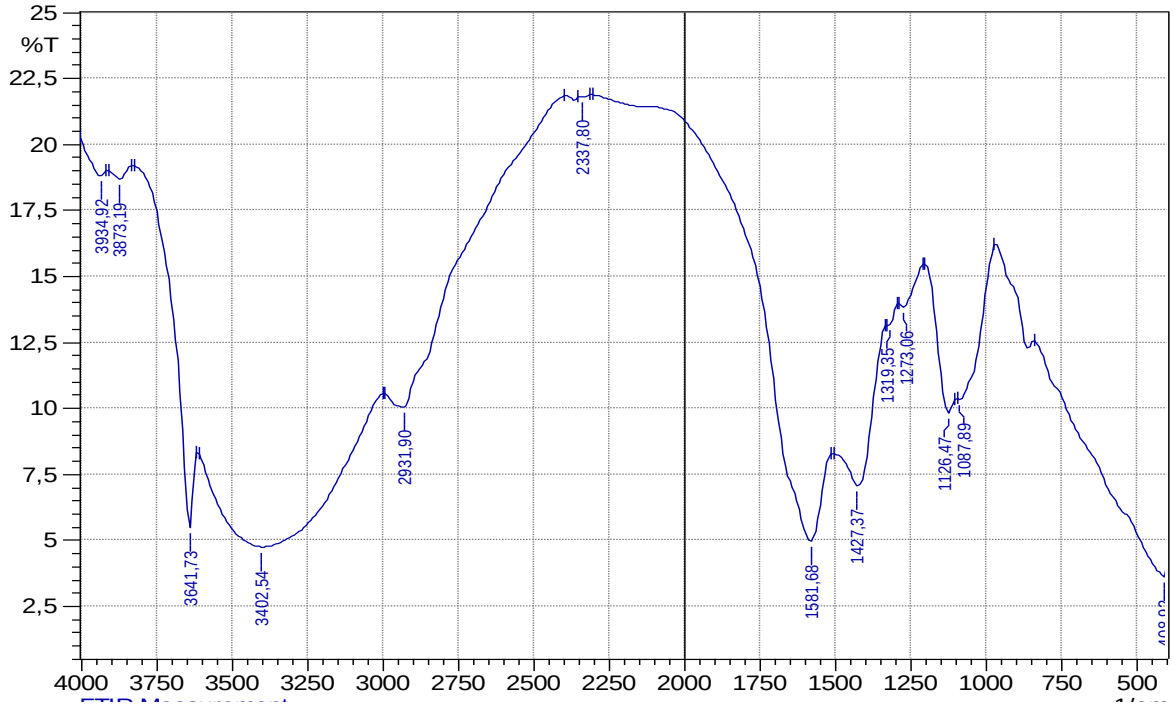


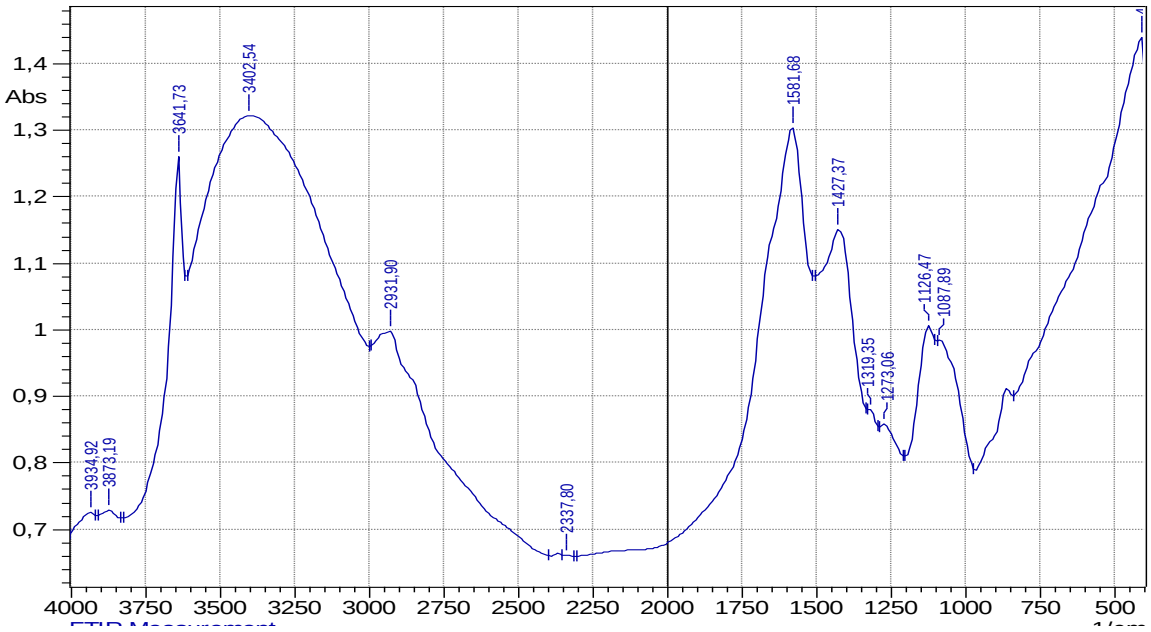
Figure 23 : Spectres infrarouge de (A) l'hydroxyde de calcium et (B) Lactate de calcium précipité.

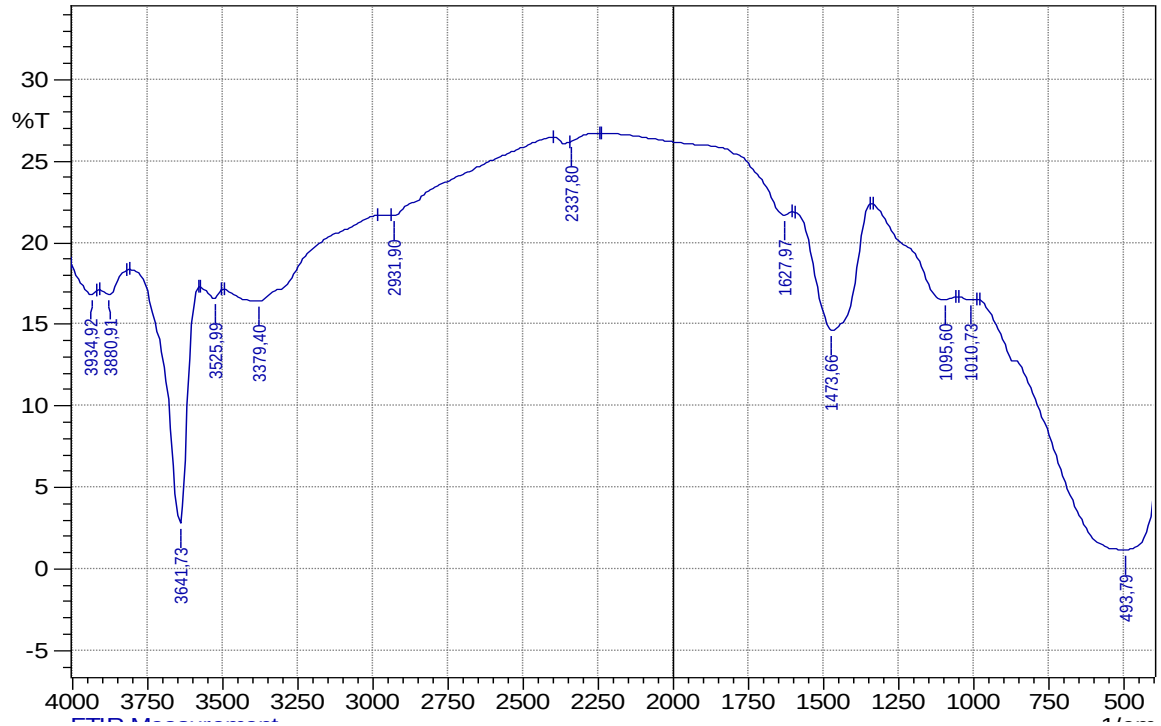
On remarque que le spectre infrarouge du lactate de calcium précipité est différent de celui de l'hydroxyde de calcium utilisé pour effectuer cette précipitation. L'analyse du spectre de lactate de calcium précipité à partir du milieu de fermentation présente des bandes intenses à 1500-1750cm^{-1}(bande **C=O**), ainsi des signaux caractéristiques ont été trouvés à 3000- 3500 cm^{-1}(Bande **OH**) et à 2750- 3000 cm^{-1} (bande **CH**) ainsi que à 1250- 1500 cm^{-1} (bande **CH**). Ce résultat est similaire à celui obtenu par (CHEONG, 2016.)Et par (AMAR, 2017)**.**

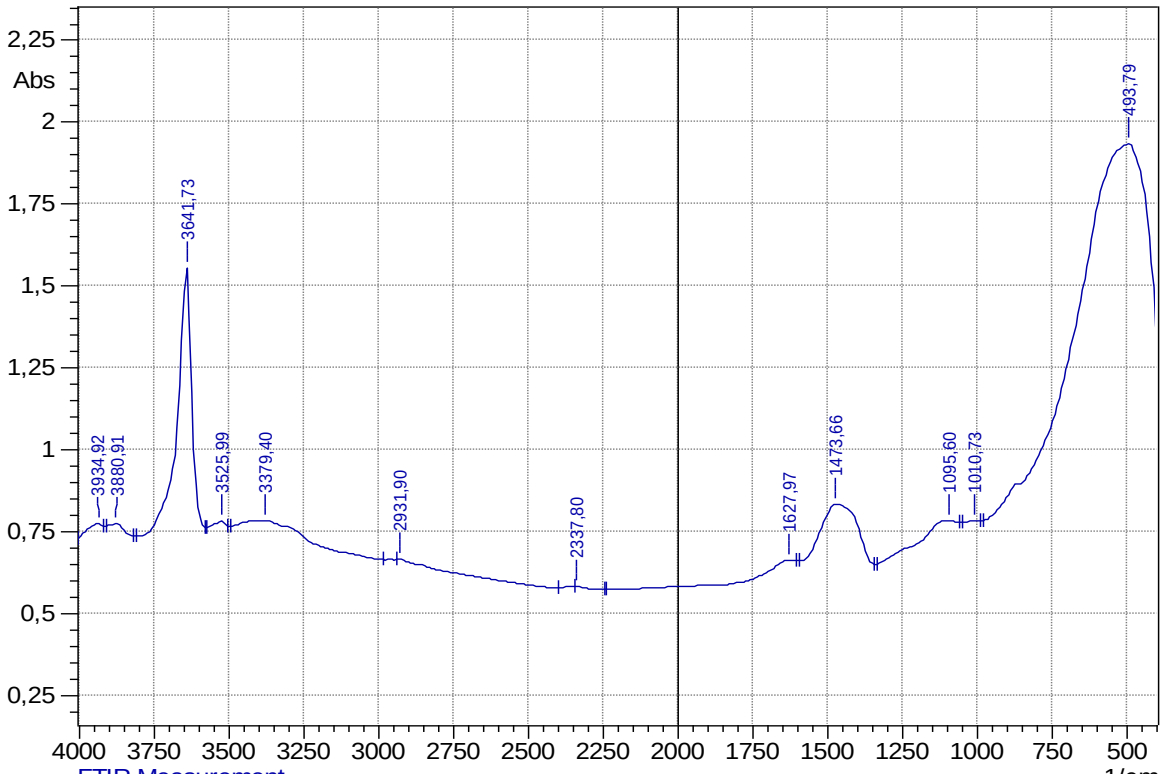
Les autres spectres d'infrarouge pour toutes les expériences et les tableaux des absorbations caractéristique (IR) de différentes liaisons sont donnés ci-dessous :

T1 35°C (graphe 01 TRANS / graphe 02 abs) **HC**

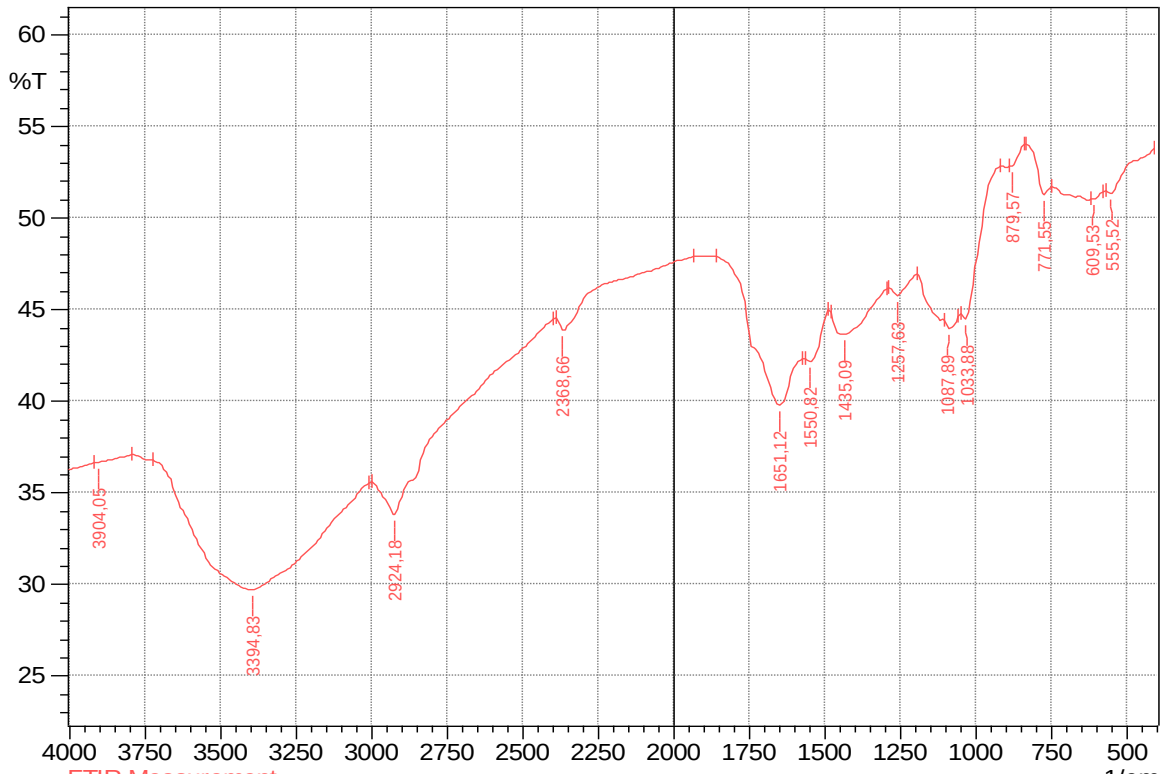


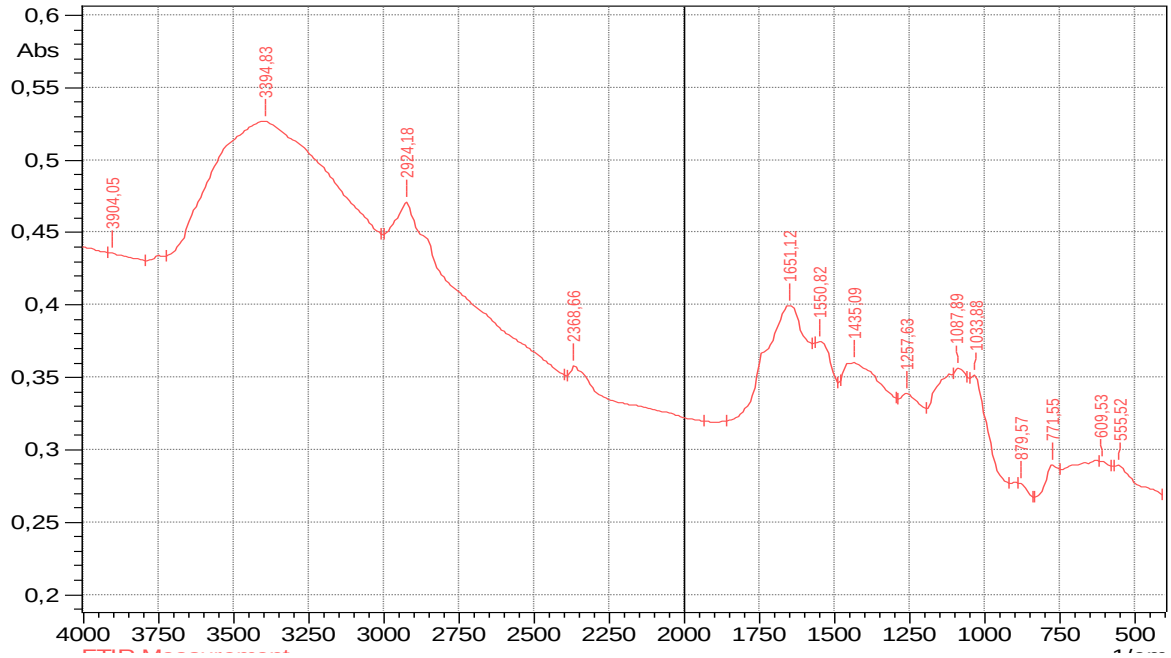



%T
30
25
20
15
10
5
0
-5
3934,92
3880,91
3641,73
3525,99
3379,40
2931,90
2337,80
1627,97
1473,66
1095,60
1010,73
493,79
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

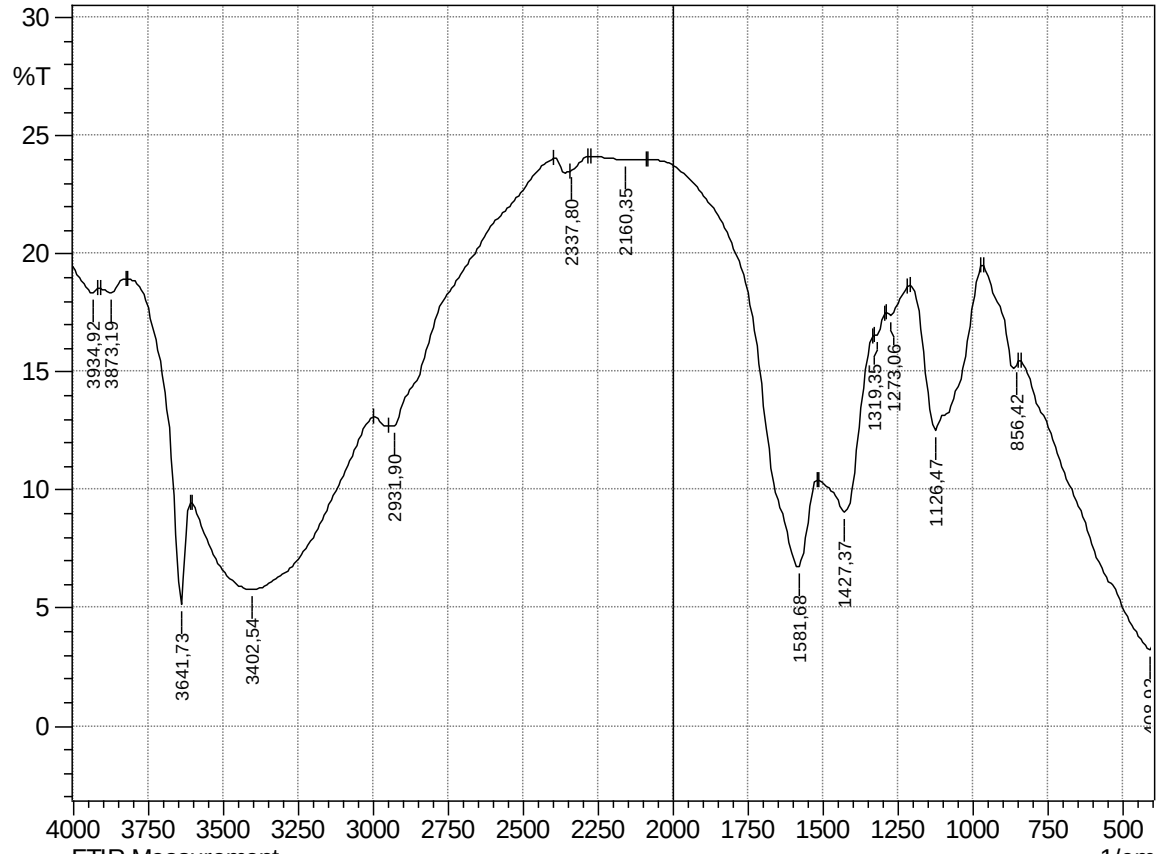

Abs
2,25
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
0,25
3934,92
3880,91
3641,73
3525,99
3379,40
2931,90
2337,80
1627,97
1473,66
1095,60
1010,73
493,79
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

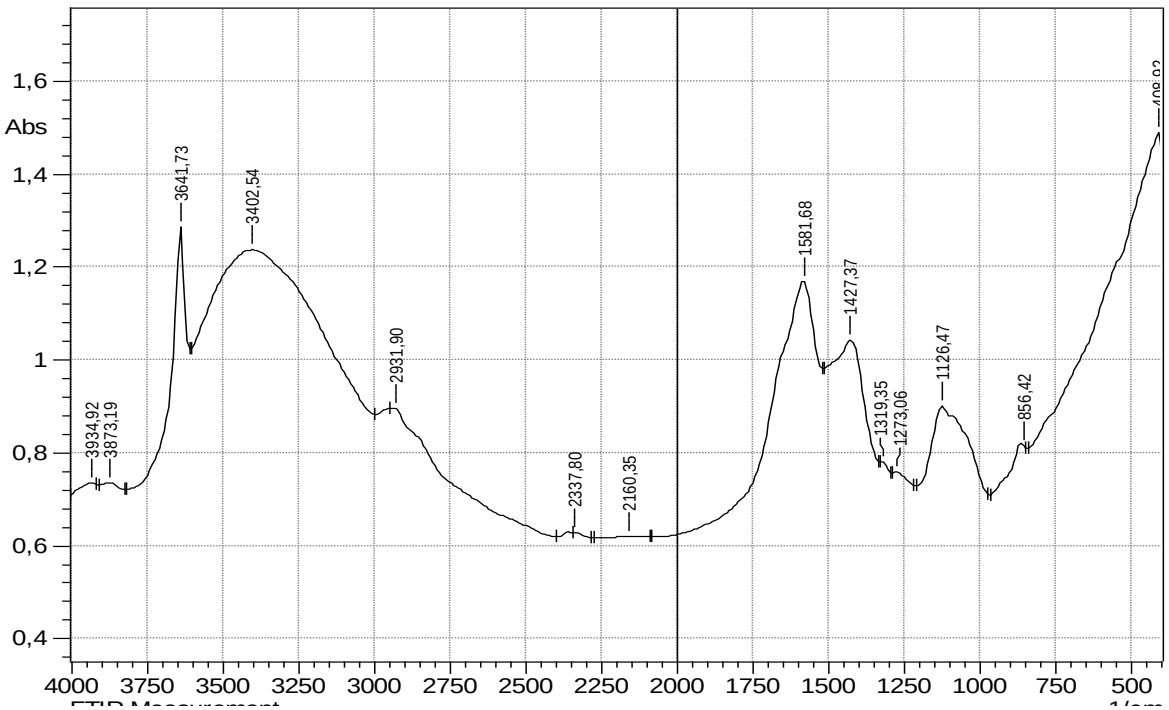
Y2 à42°c


%T
3904,05
3394,83
2924,18
2368,66
1651,12
1550,82
1435,09
1257,63
1087,89
1033,88
879,57
771,55
609,53
555,52

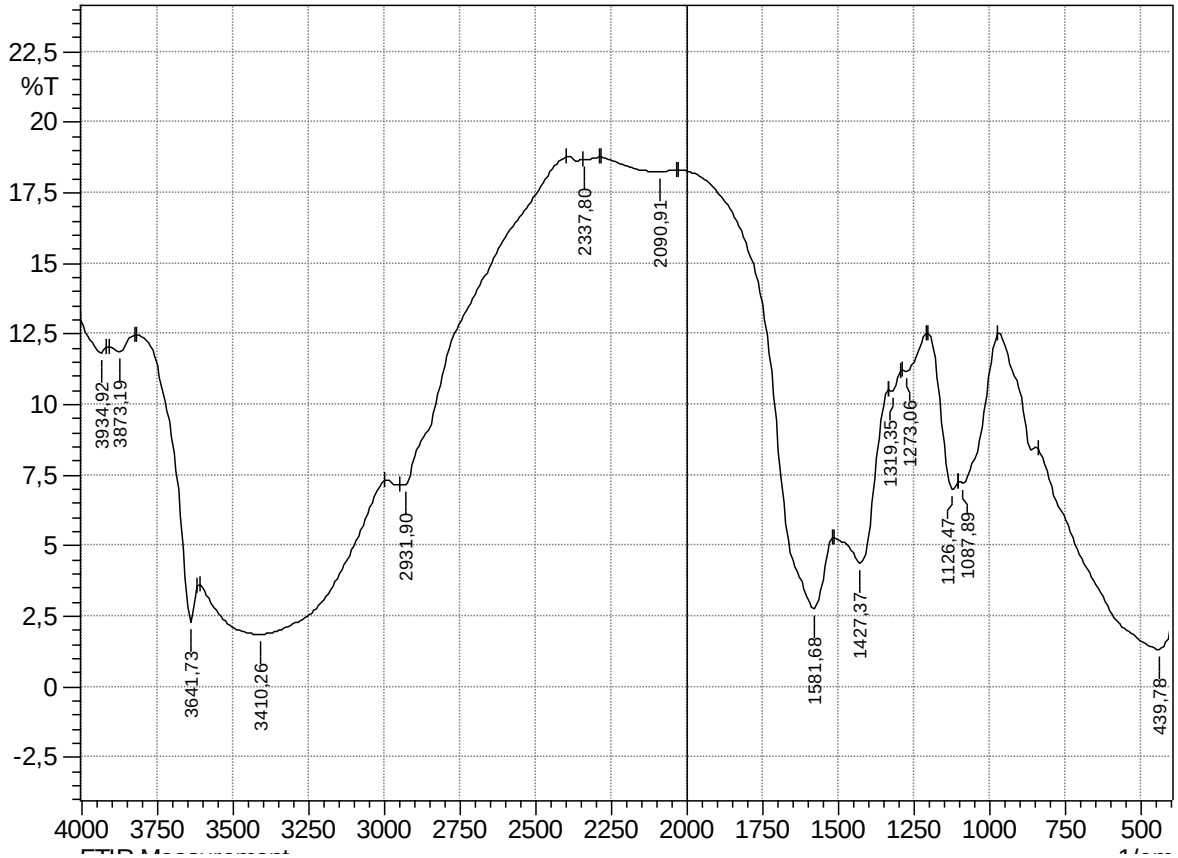

Abs
3904,05
3394,83
2924,18
2368,66
1651,12
1550,82
1435,09
1257,63
1087,89
1033,88
879,57
771,55
609,53
555,52

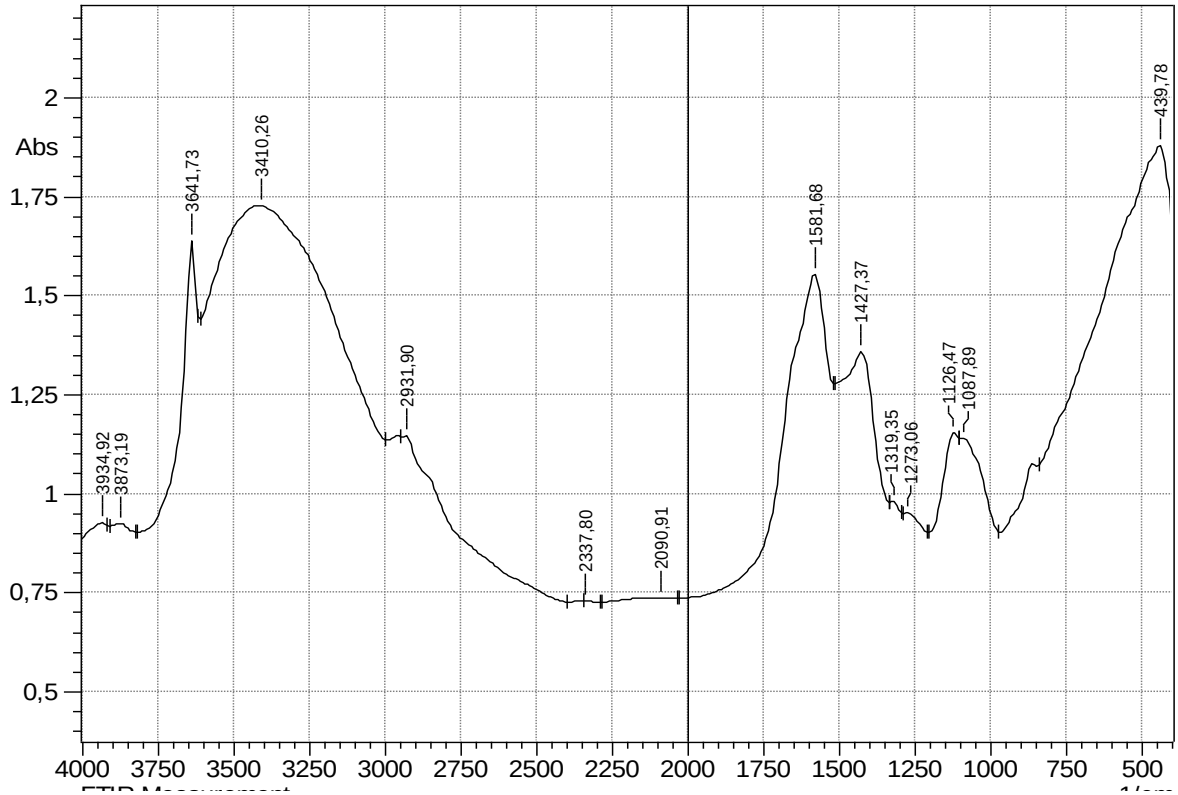
M1 27°C


%T
3934,92
3873,19
3641,73
3402,54
2931,90
2337,80
2160,35
1581,68
1427,37
1319,35
1273,06
1126,47
856,42

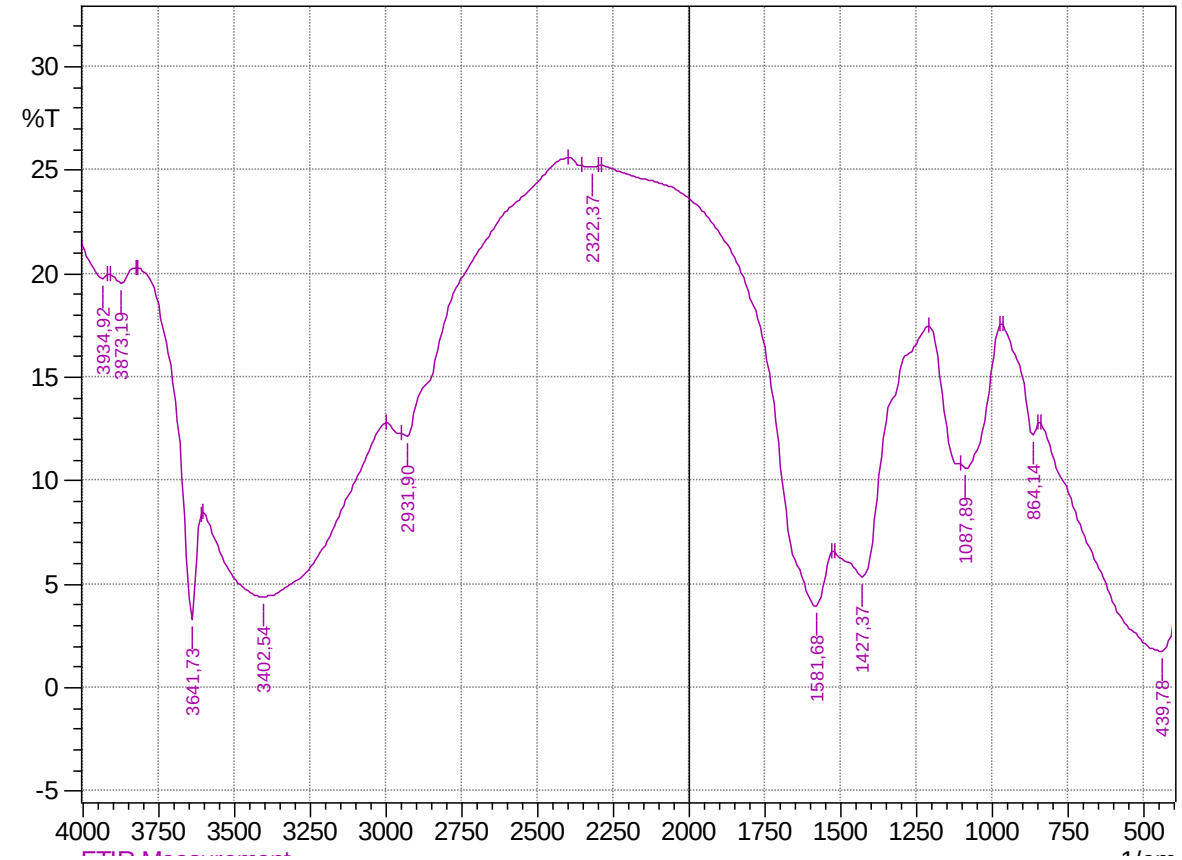

Abs
3934,92
3873,19
3641,73
3402,54
2931,90
2337,80
2160,35
1581,68
1427,37
1319,35
1273,06
1126,47
856,42

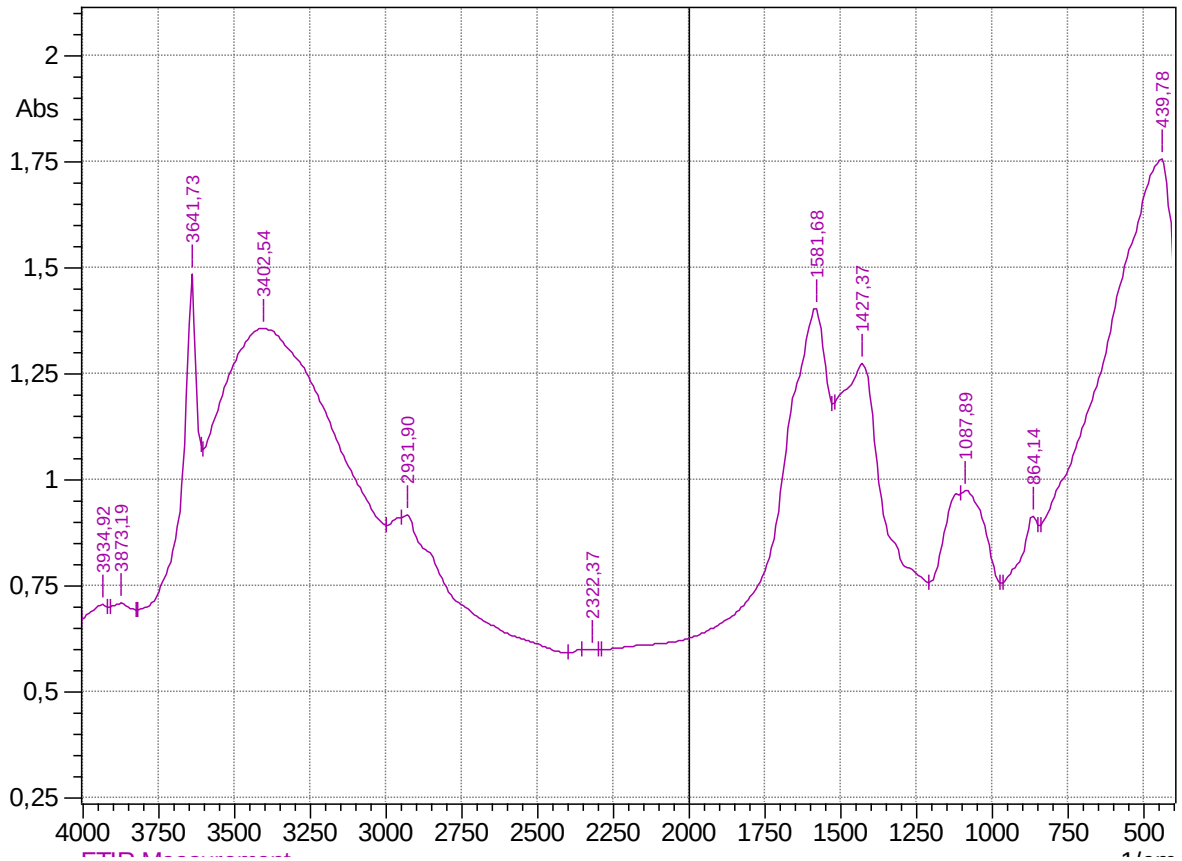
Y1 42°C


%T
22,5
20
17,5
15
12,5
10
7,5
5
2,5
0
-2,5
3934,92
3873,19
3641,73
3410,26
2931,90
2337,80
2090,91
1581,68
1427,37
1319,35
1273,06
1126,47
1087,89
439,78
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

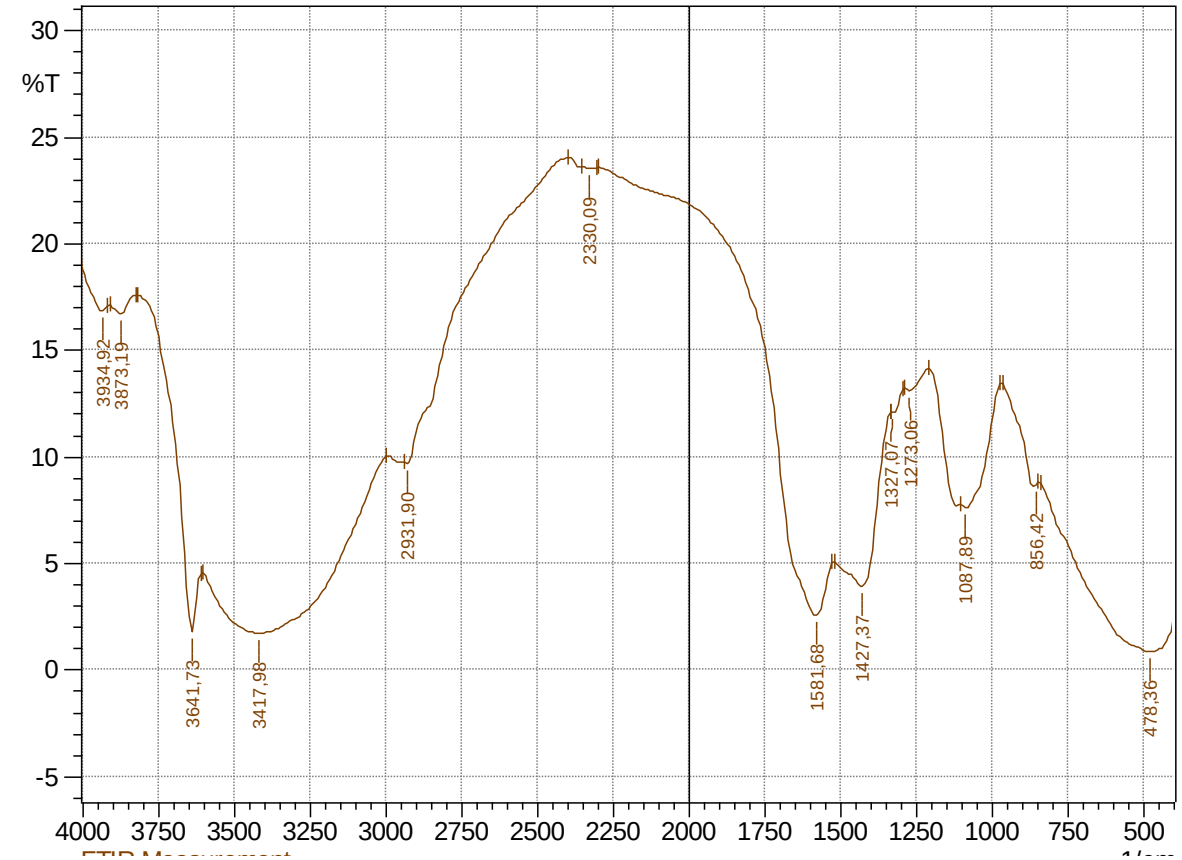

Abs
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
3934,92
3873,19
3641,73
3410,26
2931,90
2337,80
2090,91
1581,68
1427,37
1319,35
1273,06
1126,47
1087,89
439,78
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

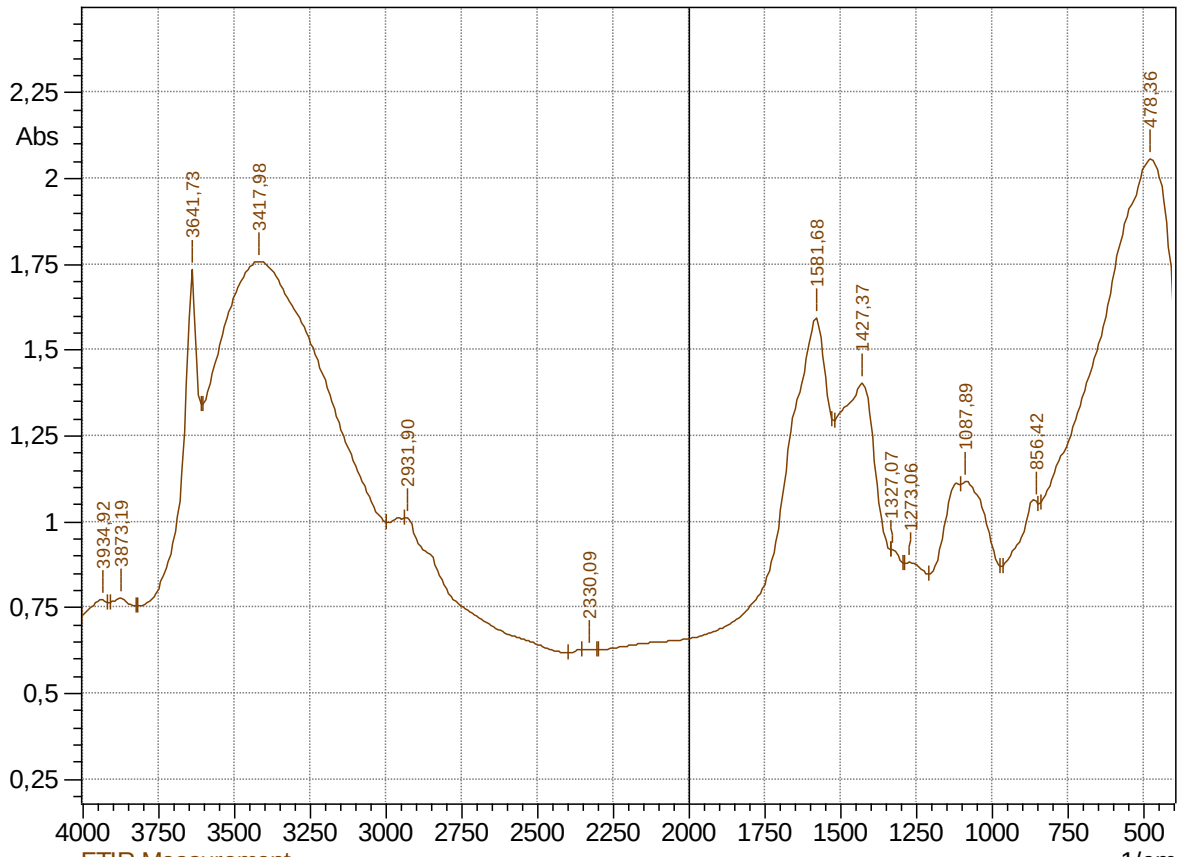
Ty 37°C


%T
30
25
20
15
10
5
0
-5
3934,92
3873,19
3641,73
3402,54
2931,90
2322,37
1581,68
1427,37
1087,89
864,14
439,78
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

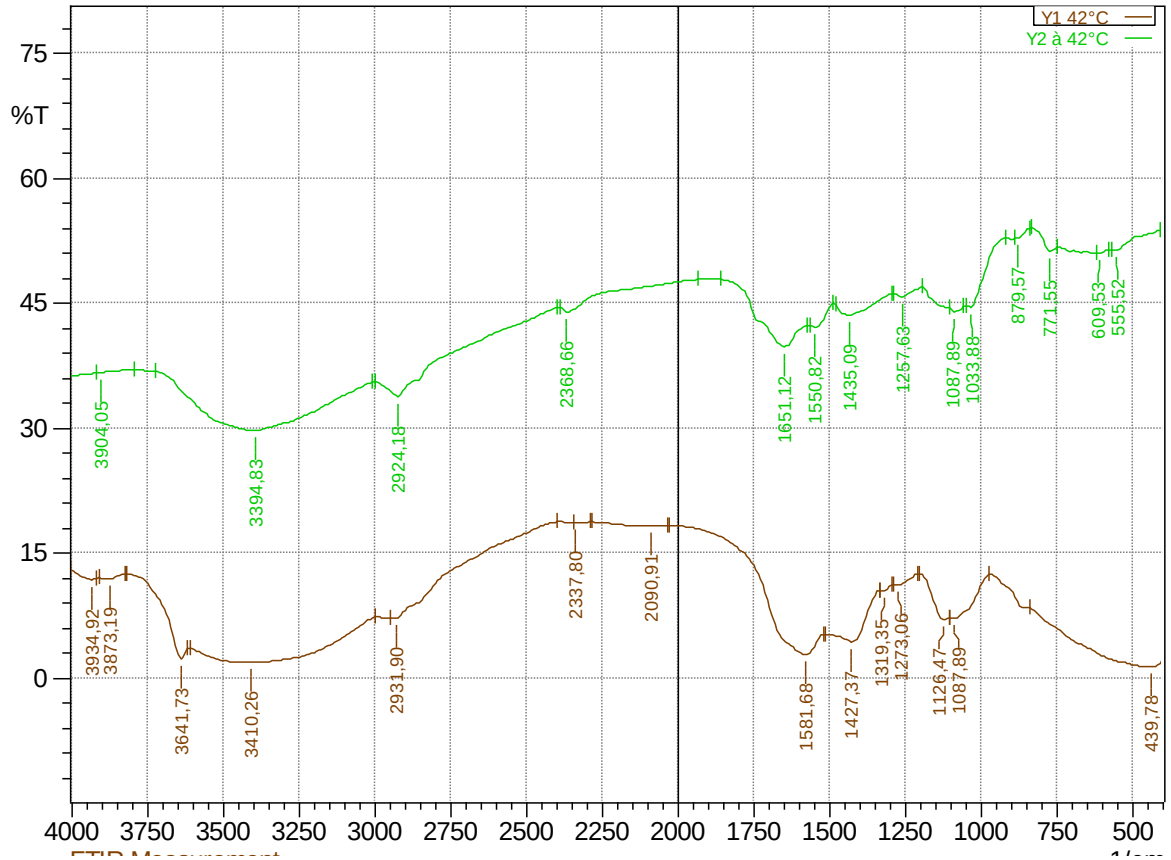

Abs
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
0,25
3934,92
3873,19
3641,73
3402,54
2931,90
2322,37
1581,68
1427,37
1087,89
864,14
439,78
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

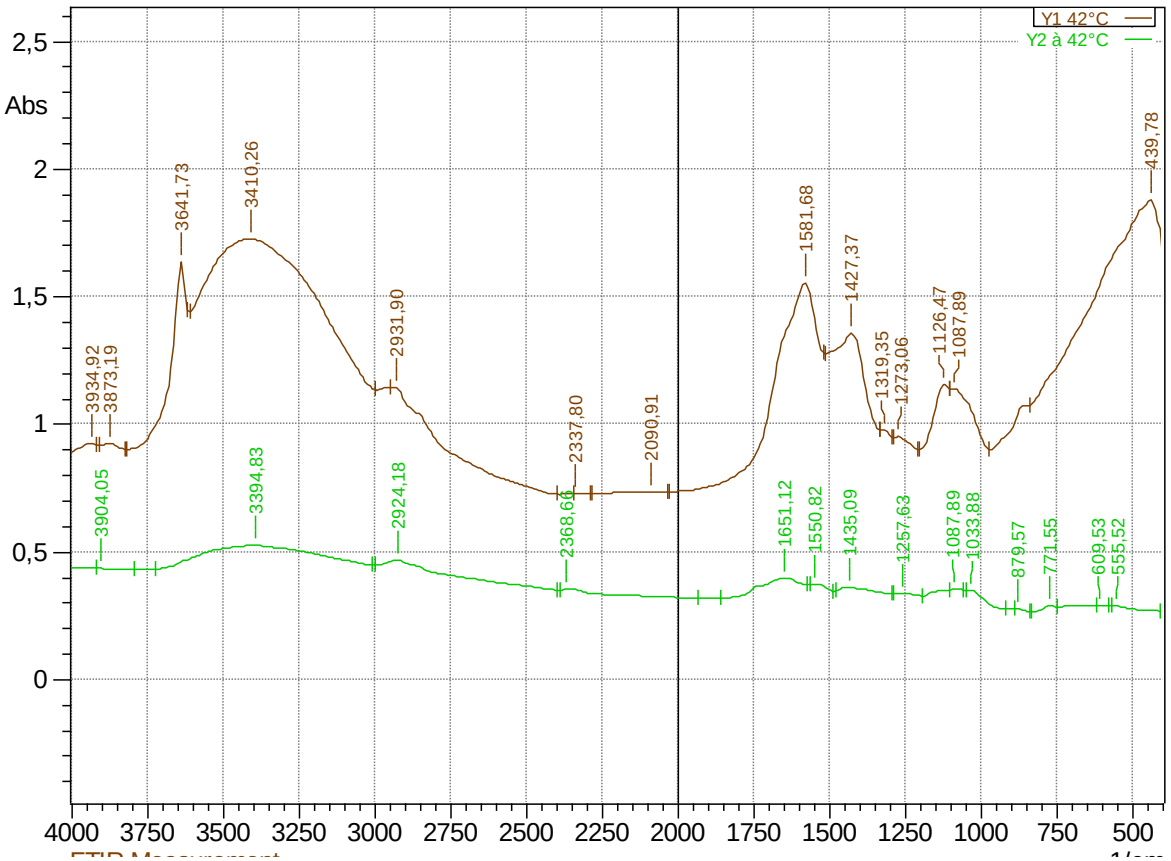
My T29°C


%T
30
25
20
15
10
5
0
-5
3934,92
3873,19
3641,73
3417,98
2931,90
2330,09
1581,68
1427,37
1327,07
1273,06
1087,89
856,42
478,36
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

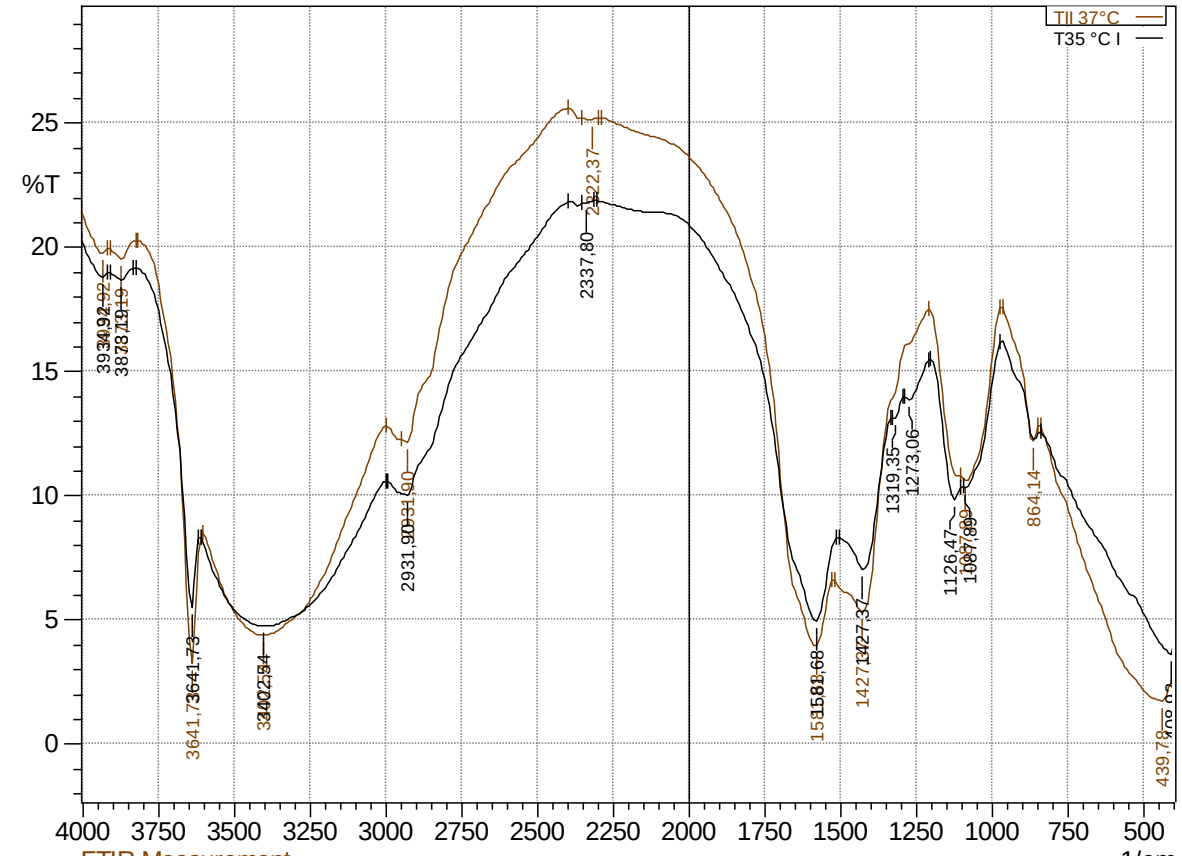

Abs
2,25
2
1,75
1,5
1,25
1
0,75
0,5
0,25
3934,92
3873,19
3641,73
3417,98
2931,90
2330,09
1581,68
1427,37
1327,07
1273,06
1087,89
856,42
478,36
4000 3750 3500 3250 3000 2750 2500 2250 2000 1750 1500 1250 1000 750 500

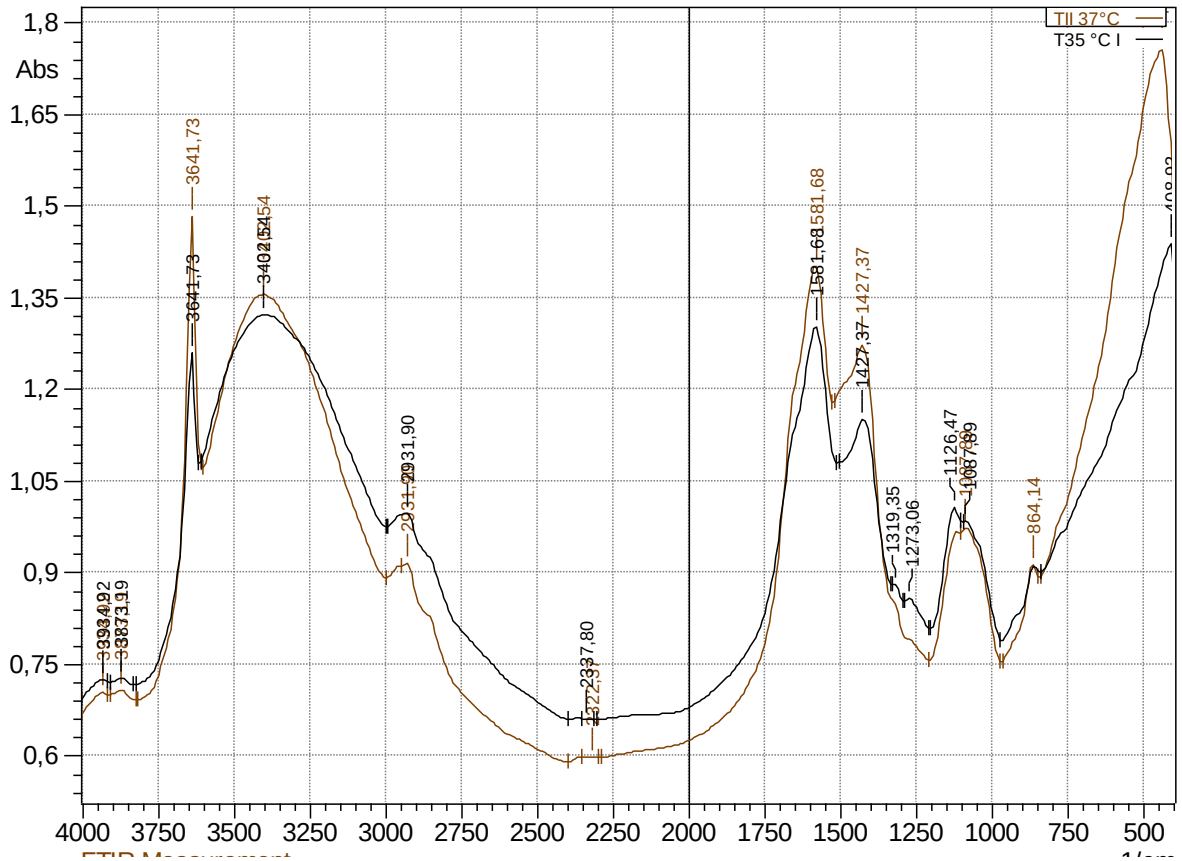
Superposé Yx et Yy



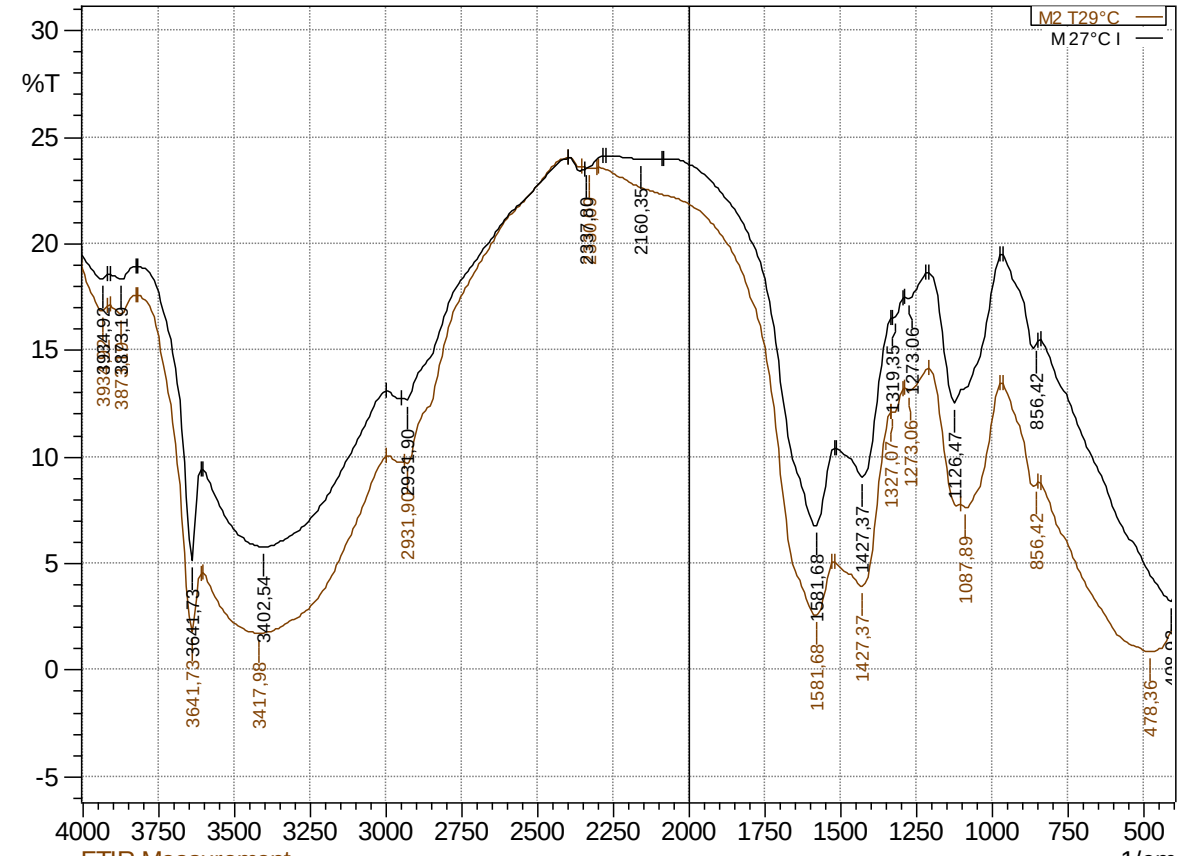


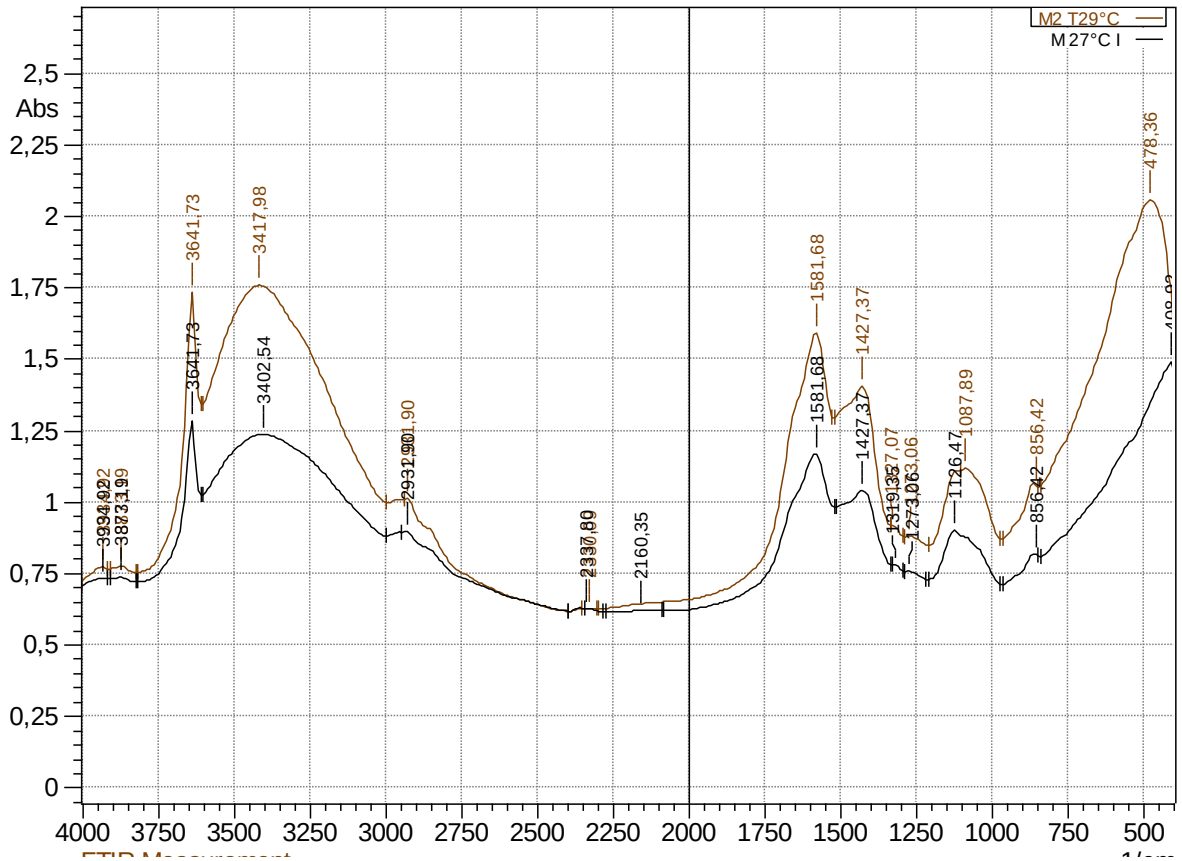
Superposé Tx et Ty





Superposé Mx et My





Conclusion Générale

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est la valorisation de lactosérum pour la production d'acide lactique à partir des trois bactéries lactiques (*Streptococcus thermophiluse et lactobacillus bulgaricus , lactococcus lactis ssp cremoris* mésophile *, lactococcus lactis ssp cremoris* thermophile *)* en utilisant une voie fermentaire.

Deux volets principaux ont été suivis lors de notre expérimentation, à savoir des fermentations en utilisant différentes souches de bactéries lactiques dans le but de produire de l'acide lactique et l'étude des facteurs qui influencent cette production ainsi que la détermination des conditions optimales (Températures et temps).
Dans une première étape et afin d'obtenir un milieu adéquat pour la fermentation nous avons procédé à une déprotéinisation de ce milieu. En revanche, nous avons constaté qu'il y a une variation du pH de 6,3 à l'état brut à 5,9 après son traitement. Cette acidification est attribuée à une dégradation du lactose qui chute de 61 g/L à 57.9 g/L.
Les résultats de l'évolution du pH du milieu de culture au cours des six expériences réalisées à différentes températures pour les trois temps choisis (24, 48 et 72h) nous ont permis d'observer une diminution de pH initial ce qui montre le bon déroulement de la fermentation. En outre, l'étude de pouvoir d'acidification des différentes souches en déterminant l'écart de pH entre le temps initial et la fin de la fermentation (ΔpH). En effet, nous avons constaté que la souche *Lactococcus lactis ssp cremoris* thermophile a donné l'écart le plus élevé. Ces résultats ont été confirmés par le test de mesure de l'acidité.

Le criblage des bactéries lactiques a montré que la souche *lactococcus lactis ssp cremoris* thermophile possède une bonne aptitude à produire de l'acide lactique dont la concentration est de l'ordre de 5.66g/l sur 300 ml de milieu à base de lactosérum et à température de 39 °C.
la production de l'acide lactique par la souche *lactococcus lactis ssp cremoris* thermophile a connu une évolution continue qui n'a pas cessé d'augmenter jusqu'à 72h ou elle est ralentie et devient stationnaire à partir de 75h jusqu'à la fin de la fermentation. En parallèle une dégradation de lactose a été observée.
La précipitation de l'acide lactique produite par la souche *lactococcus lactis ssp cremoris* thermophile a été réalisée dans notre travail en utilisant l'hydroxyde de calcium. L'analyse du spectre de lactate de calcium précipité à partir du milieu de fermentation présente des bandes intenses à 1500-1750cm^{-1}(bande **C=O**), ainsi des signaux caractéristiques ont été trouvés à

3000- 3500 cm^{-1}(Bande **OH**) et à 2750- 3000 cm^{-1} (bande **CH**) ainsi qu'à 1250- 1500 cm^{-1} (bande **CH**).

A l'avenir, il serait opportun de compléter notre présent travail par d'autres études plus approfondies notamment :

- Optimisation de la production d'acide lactique à partir des sous-produits alimentaires solides.
- Purification de l'acide lactique à partir de lactate du calcium précipité.

Références Bibliographique

Références Bibliographie

Aarnikunnas, J. S. (2006). *Ingénierie métabolique des bactéries lactiques et caractérisation de nouvelles enzymes pour la production des composés d'importance industrielle.*

Abdelali, Z. e. (2021). *Taxonomie numérique et étude phylogénétique des bactéries isolées de lait cru de vache.*

ADRIAN, J. L. (1981). *Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition.* FRANGNE.

AMAR, B. E. (2017). *Essai de production de molécules biologiques par voie fermentaire.* master? algérie , UNIVERSITE YAHIA FARES MEDEA, medea.

AMRANE, A. e. (1997). Couplage croissance et production d'acide lactique pour Lactobacillus helveticus cultivé sur lactosérum supplémenté : influence de la carence en azote peptidique. *Journal de biotechnologie, vol. 55*(n° 1), 1-8.

Arevalo, T. (2017). *Étude environnementale comparative des procédés de valorisation du lactosérum.* Québec,canada: maitrise en génie agroalimentaire.

BENBEGUARA, M. (2003). *effet des traitements microon des sur les propriétés émulsifiantes du lactosérum.* Université Ibn Khaldoun. Tiaret: Université Ibn Khaldoun.

Benhamada, A. e. (2020). *Identification phénotypique et moléculaire des bactéries lactiques.* master , Université de Jijel-algérie , Jijel-algérie.

Bergeron, G. J. (2014).

Bergeron, G. J. (2014). *Utilisation Du Lactosérum Dans Un Procédé de Culture de Microalgues Mixotrophes Pour la Production de Biodiesel.* Sherbrooke: Université de Sherbrooke.

BÖRGARDTS, P. K. (1998). *Integrated bioprocess for the simultaneous production of lactic acid and dairy sewage treatment.* Bioprocess Engineering.

BOUDJEMA, K. F.-N. (2009). Optimisation et modèle de production d'acide lactique par Streptococcus thermophilus sur lactosérum.. *BOUDJEMA, K., FAZOUANE-NAIMI, F., HELLAL, A., et al. Optimisation et modèle de production d'acide lactique par Streptococcus thermophilus sur lactosérum. Sciences & Technologie. C, Biotechnologies, 2009, p. 80-90.*, pp. BOUDJEMA, K., FAZOUANE-NAIMI, F., HELLAL, A., et al. Optimisation et modèle de production d'acide la p. 80-90.

BOUDJEMA, K. F.-N. (2009, Juin). *Optimisation et modèle de production d'acide lactique par Streptococcus thermophilus sur lactosérum.* Université Mentouri Constantine, Algérie. Constantine, Algérie, Juin 2009: C, Biotechnologies.

Boulkhiout S, e. a. (2021). *Rôle des substances antimicrobiennes des bactéries lactiques dans la bio conservation des aliments.* Université de jijel, jijel-algérie.

CHAMBA, J. e. (1989). Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait, vol. 69*(n° 5), p. 417.

CHEONG, S. H. (2016.). Physicochemical properties of calcium lactate prepared by single-phase aragonite precipitated calcium carbonate. *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES, vol. 7*(no 1), p. 1786-1794.

Chikh Mohamed Azim, A. Y. (2001). Contribution a l'étude et a la Valorisation du lactosérum. p2. Jijel, Jijel, Algérie: Institut des Sciences de la Nature Centre universitaire Abdelhak Ben Hamouda.

dalal, t. i. (2018). *étude cinétique de la réaction de la fermentation des dattes pour les transformer en bioéthanol.* tourqui imene & zane dalal, étude cinétique de la réaction de la fermentation des dattes pour les transformer en bioéthanol, génie chimique, génie des procé université echahid hamma lakhdar eloued. eloued, algérie: génie chimique, génie des procédés et pétrochimie, sciences et technologie, faculté de technologie.

Dalal, T. I. (2018). *Étude cinétique de la réaction de la fermentation des dattes pour les transformer en bioéthanol.* MASTER ACADEMIQUE, UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR –EL-OUED, –EL-OUED- algérie.

Djahida, B. M. (2019). *Screening de souches de bactéries lactiques à activité anti-Aspergillus isolées du blé fermenté traditionnellement.* master en science biologique , département de microbiologie appliquée et sciences alimentaires , jijal-algérie.

DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. P.-S. (2012). *Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage.* ELSIVIER.

Fessard, A. (2017). *Recherche des bactéries lactiques autochtones capables de mener la fermentation de fruits tropicaux avec une augmentation de l'activité antioxydant.* paris: Université de la Réunion, France.

GHAFFAR, T. I. (2014). Tendances récentes de la biotechnologie de l'acide lactique: une brève revue de la production à la purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences, vol. 7*(n° 222), p224.

HALASSI, I. (2022). *Evaluation du métabolisme lipidique des Odonates bioindicatrices de la qualité de l'eau des écosystèmes aquatiques et étude de leur microflore au cours de leur cycle de développement.* el hassi algérie : université el hassi.

Henry-Eric, S. e. (1998). *Technologies de transformation des produits agro alimentaires.* Techniques de l'ingénieur. canada: Techniques de l'ingénieur, Bioprocédés .

HENTON, D. E. (2005). *Polylactic acid technology. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites.*

IKRAM, B. M. (2020). *Pouvoir inhibiteur et résistance au stress chez les bactéries lactiques.*

ILMÉN, M. K. (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by Pichia stipitis. *Applied and environmental microbiology, vol. 73*(no 1), p 117-123.

IMENE, B. (2020). *Caractérisation des activités protéolytiques des souches autochtones de Lb. plantarum, Lb.acidophilus et Lb .casei pour l'élaboration d'un ferment à haute aptitude fromagère.* université abdelhamid ibn badis mostaganem, spécialité production et transformation laitiére, mostaganem.

Références Bibliographie

KOMESU, A. D. (2017). *Lactic acid production to purification.* a review. BioResources, BioResources. a review. BioResources,.

LITCHFIELD, J. H. (1996). *Microbiological production of lactic acid. Advances in applied microbiology,.* Advances in applied microbiology.

LITCHFIELD, J. H. (2009). *Lactic acid, microbially produced.*

Malika, Meziane. (2008). *production en continu de l'acide lactique et du diacétyle par lactococcus lactis ssp immobilisé sur pouzzolone dans un bioréacteur a lit fixe.* université hassiba ben bouali chelef, agronomique . chelef: faculté des sciences agronomique et sciences biologique.

Martinez, F. A. (2013). lactic acid properties, applications and production: a review. (F. A. Martinez, Éd.) *vol 30*(no 1), p71.

Mermouri. (2018). *Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (Lactobacillus spp.), Isolées e Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage.* oran-algérie: Mermouri l, Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de Bactéries Lactiques (Lactobacillus spp.), Isolées e Produits Fermentés, sur la Valeur Nutritive Université des Sciences et de la Technologie d'oran mohamed-boudiaf.

MERYEM, T. R. (2020). *Valorisation du lactosérum et recherche de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées à partir du lactosérum. .* diplôme de master en science biologique, Université Djilali Bounaâma de Khemis-Miliana, Khemis-Miliana . algérie.

MICHEL, A. (1986). *Production de protéines de levures à partir de lactosérum brut.* Thèse de doctorat., Lyon 1.

morabito, D. (1994). *production d'acide lactique par lactobacillus casei sur lactosérum, études cinétiques, modélisation et simulation de procède intègre.* thése, institu national polytechnique de lorraine, thèse présentée à l'inpl, Daniel morabito, production d'acide lactique par lactobacillus casei sur lactosérum, études cinétiques, modélisation et simulation de procède intègre, thèse présentée à l'inpl, laboratoire des sciences du génie chimique, centre national de recherche scien.

Moussa Ben Lahmer et autres, .. (2019). *Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques.* diplome master , Moussa Ben Lahmer et autres, Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques, Faculté des sciences de la nature et d Université Djilali Bounaama - Khemis Miliana, Algérie, Moussa Ben Lahmer et autres, Etude du pouvoir acidifiant des bactéries lactiques, Faculté des sciences de la natKhemis Miliana, Algérie.

naima, a.-o. (2018). *optimisation des paramètres de fermentation pour la production d'acide lactique par streptococcus thermophilus sur lactosérum.* aliane-ourahmoune naima, optimisation des paramètres de fermentation pour la production ensa, algérie.

NARAYANAN, N. R. (2004). *L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization.*

NARAYANAN, N. R. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology, vol 7*(no 2), p165.

Nesrine, A. A. (2019). *Etude du pouvoir protéolytique des bactéries lactiques.* diplome de master en microbiologie appliquée, Département de biologie, université djilali bounaama-khemis miliana-algérie, khemis miliana-algérie.

Palacio, G. (2007). *Modélisation et commande floues de type Takagi-Sugeno Appliquées à un bioprocédé de traitement des eaux usées.* Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Pandey, A. C. (2000). *New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products.* Process biochemistry.

PANESAR, P. S. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food chemistry.* Elsiver.

PAYOT T, C. Z. (1999). Lactic acid production by Bacillus coagulans kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme and Microbial Technology, vol 24* (no 3-4), p192.

Reddy G, e. a. (2008).

REN, J. (. (2011). *Biodegradable poly (lactic acid): synthesis, modification, processing and applications.* Springer Science & Business Media. Springer Science & Business Media.

ren, j. e. (2011). *biodegradable poly (lactic acid): synthesis, modification, processing and applications.* springer science & business media.

ROSALES, E. C. (2007). *Augmentation de la production de laccase par Trametes hirsuta cultivé sur des pelures d'orange moulues.* ROSALES, Emilio, COUTO, Susana Rodríguez, et SANROMÁN, Ma Angeles. Augmentation de la production de laccase par Trametes hirsuta cultivé sur des Technologie enzymatique et microbienne, Spain.

ROUMAISSA, B. e. (2021). *, Propriétés probiotiques des bactéries lactiques,.* thése de doctorat , Université laarbi tebessi, Tébessa, Algérie.

Sia Abdelhak, A. M. (2020). *Fractionnement et modélisation cinétique de production des protéases exo-cellulaire de penicillium condidum cultivé sur milieu a base de lactosérum industriel.* oum bouaghi.

SLIMOUNE, F. Z. (2020). *Viabilité des bactéries lactiques encapsulées avec des extraits de plantes dans les conditions gastro-intestinales simulées.* université mohammed seddik ben yahia . jijel-algérie: département de microbiologie appliquée et sciences alimentaires.

SOTTIEZ, P. (1990). *Produits dérivés des fabrications fromagères in: lait et produits laitiers; vache, brebis, chèvre.* france, Paris: Ed Lavoisier.

TAMINE, M. (2019). *Production d'acide lactique par Lactococcus lactis subsp. lactis sur jus de figuier de barbarie (Opuntia ficus indica). .* univ-setif.dz. setif.dz: Opuntia ficus indica.

Références Bibliographie

Tamine, M. (2019). *Production d'acide lactique par Lactococcus lactis subsp, lactis sur jus de figuier de barbarie (Opuntia ficus indica),.*

TERRE, S. (1986). Proprietes technologiques nutritionnelles et physiologiques de Streptococcus thermophilus et Lactobacillus bulgaricus. *Technique laitière et marketing, p. 26-39.*(no 1008), p. 26-39.

Thilleli, D. N. (2019). *la valorisation du lactosérum par incorporation dans des produits laitiers.* Bouira: Dahache Narimane et Messaoudi Thilleli, la valorisation du lactosérum par incorporation dans des produits laitiers, département d'agronomie, faculté des suniversite akli mohand oulhadj.

Thomas L, L. C. (2013). *Current developments in solid-state fermentation.* Biochem Eng J 81.

Trivino Arevalo, A. (2017).

VIJAYAKUMAR, J. A. (2008). Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *vol. 22*(no 2), p 245-264.

Viniegra-González, G. e. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal 13, 2-3, 13*(2-3), p157.

Wee, Y.-J. J.-N.-W. (2006). *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications.* Food Technology and Biotechnology 44.2. Food Technology and Biotechnology .

XIAO, L. W. (2012). Poly (lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications. *Biomedical science, engineering and technology., vol. 11*, p247-282.

Yassine, H. e. (2017). *Isolement et caractérisation des bactéries lactiques dans le smen traditionnel algérien.* master analyses biologique et biochimiques, UDB-khemis miliana, khemis miliana-algérie .

Zenati, R. e. (2018). *Fermentation d'Aspergillus niger cultivé sur milieu à base de lactosérum.*

ZHANG, Z. Y. (2007). *Production d'acide lactique à partir de matières renouvelables par les champignons Rhizopus.*

Annexe 01 : (Verrerie, appareils et produits chimiques utilisés)

Verrerie	**appareils**	**produits chimique**
Erlenmeyer 500 ml	Autoclave	Eau distillé
Eprouvette	Etuve bactériologique	Na Cl,
Fiole	Balance de précision	Acide sulfurique
Pipette graduée	Bain-marie	Noah
Poire	Centrifugeuse	Hydroxyde de calcium
Pipette pasteur	Spectrophotomètre	HCL
Boite de pétri	pH-mètre	
Erlenmeyers de 500 ml,	Incubateur avec son système d'agitation et de régulation de température	
Bicher 1 L	Vortex,	
Pipettes automatiques	Agitateur magnétique,	
	Micropipette	
	Spectroscopie infra rouge	

Annexes 02 : (Les certifications des bactéries)

Cryofast MO 040 CR

Description

Cryofast MO 040 CR consists of specifically selected strains of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* to ensure a uniform and controlled production of fresh cheese, soft cheese, semi-hard cheese, and hard cheese.

Application

Add the pellets directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

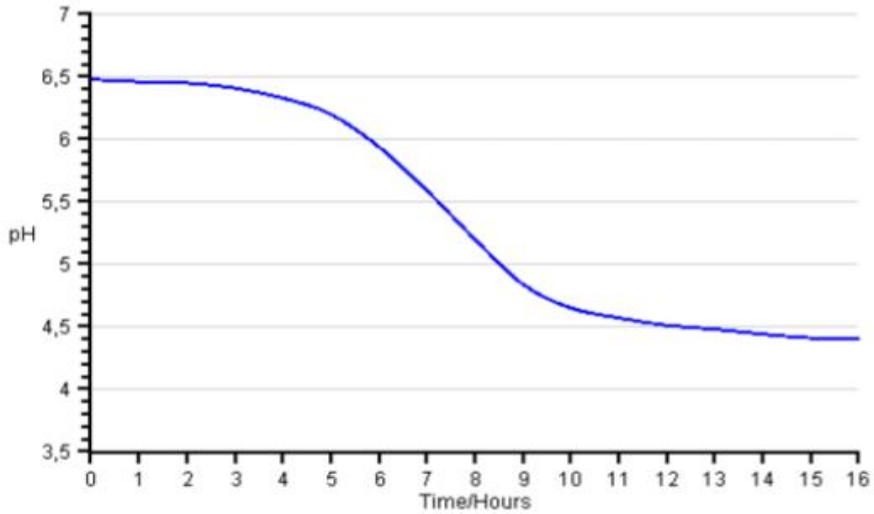
Product	UC/100 l	Product	UC/100 l
Fresh cheese	0.5-2.0	Soft cheese	0.7-2.0
Cottage cheese	1.0-10.0	Semi-hard cheese	0.5-1.5

Rotation

The recommended rotations are Cryofast MO 041 CR/MO 042 CR

Acidification information

Standardised laboratory acidification test is conducted in milk powder, reconstituted at 9 %, at defined temperature.
Acidification profile: inoculation level corresponding to 1 UC per 100 litres milk.
Standard activity: expressed as temperature/time/pH relations: 32°C/7.5 hours/pH 5.4 ± 0.1.



Culture information

Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines.

Optimal temperature for growth	22-34 °C	Scalding temperature	Max. 43°C
Acidification capability	pH 4.3		

Storage

Unopened pouches should be kept at or below -40°C.

Package data

Deep-frozen pelletised culture. Cryofast MO 040 CR is available in 50 UC. The deep-frozen culture is packed in waterproof and air proof PET/PE doy-pack pouches.

Cryofast MO 040 CR

Shelf life	12 months when stored at or below -40°C.		
Heavy metal specification	Pb (lead) Hg (mercury) Cd (cadmium)	< 1 ppm < 0.03 ppm < 0.1 ppm	
	** Analysed on regular basis.*		
Microbiological specification	*Bacillus cereus* Coagulase positive staphylococci* Enterobacteriaceae *Escherichia coli* *Listeria monocytogenes** Moulds & yeasts *Salmonella* spp*	<100 CFU/g <10 CFU/g <10 CFU/g <1 CFU/g Not detected in 25 g <10 CFU/g Not detected in 25 g	Method: Sacco M10 (1) Method: Sacco M11(2) Method: Sacco M2 (3) Method: Sacco M27 (4) Method: Sacco M13 (5) Method: Sacco M3 (6) Method: Sacco M12 (7)
	** Analysed on regular basis. All analytical methods are available upon request.* *(1)ISO 7932; (2)ISO 6888-1-2; (3)ISO 21528-1-2; (4)ISO11866-1-2/IDF 170-1-2; (5)ISO 11290-1-2; (6)ISO 6611/IDF 94; (7)ISO 6785/IDF 93.*		
GMO	The microbial strains are not genetically modified (GMO) in accordance with the European Directive 2001/18/EC. The strains are isolated from natural sources. The raw materials used are also GMO free in accordance with Regulation (EC) No. 1829/2003 and Regulation (EC) No. 1830/2003. Statement available upon request.		
Allergens	The raw materials used are generally based on dairy ingredients. All materials are free of the following components and their derivates: peanut, tree nut, sesame, egg, fish, shellfish, mollusc, crustacean, sulphite, cereals containing gluten, celery, mustard, soy and lupine. Statement available upon request.		
Safety information	Material Safety Data Sheet available on www.saccosrl.it		
Certificate	Lot certificate available upon request.		
ISO Kosher approval	Sacco S.r.l. is UNI EN ISO 9001:2008 certified since 1998, ISO 22000:2005 and FSSC 22000 certified since 2014. Sacco cultures are generally Kosher approved except for surface ripening cultures.		
Service	Please contact your distributor for guidance and instructions for your choice of culture and processing. Information about additional package sizes and sales units is also available upon request.		
Liability	This information is based on our knowledge trustworthy and presented in good faith. No guarantee against patent infringement is implied or inferred.		

Lyofast MW 039 S

Description

Lyofast MW 039 S consists of undefined strains of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and defined strains of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*.
Lyofast MW 039 S ensures a uniform and controlled production of fresh cheese, and soft cheese.

Application

Sprinkle the culture powder directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

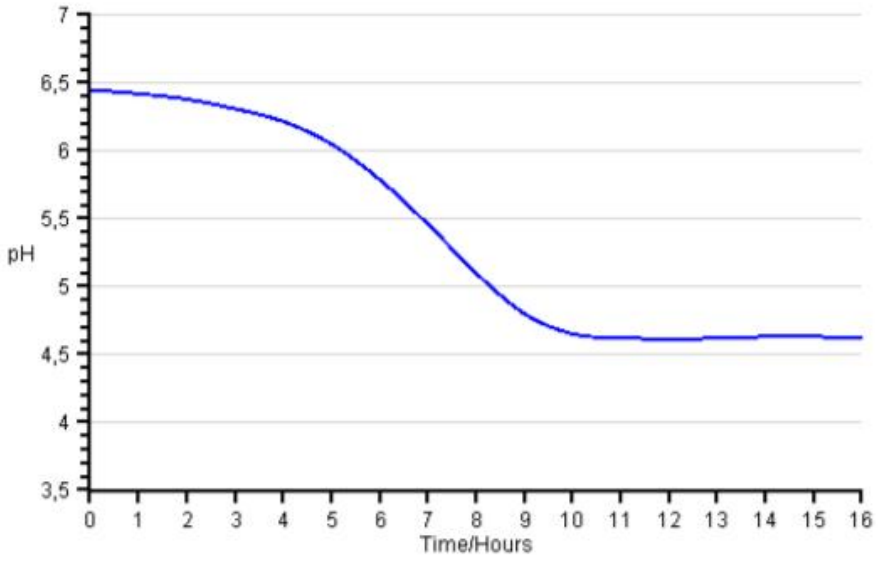
Product	UC/100 l	Product	UC/100 l
Fresh cheese	0.5-2.0	Soft cheese	0.7-2.0

Rotation

The recommended rotation is available upon request.

Acidification information

Standardised laboratory acidification test is conducted in milk powder, reconstituted at 9%, at defined temperature.
Acidification profile: inoculation level corresponding to 1 UC per 100 litres milk.
Standard activity: expressed as temperature/time/pH relations: 32°C/7.5 hours/pH 5.2 ± 0.1.



Culture information

Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines.

Optimal temperature for growth	25-35 °C	Scalding temperature	Max. 39°C
Acidification capability	pH 4.4	Gas production/citrate/urea	+++

Storage

Unopened pouches should be kept below -17°C.

Package data

The freeze-dried culture is packed in waterproof and airproof aluminium pouches. The packaging material is food grade. Lyofast MW 039 S is available in 10 and 50 UC.

Lyofast MW 039 S

Shelf life

18 months when stored below -17°C.

Heavy metal specification

Pb (lead)	< 1 ppm
Hg (mercury)	< 0.03 ppm
Cd (cadmium)	< 0.1 ppm

** Analysed on regular basis.*

Microbiological specification

Bacillus cereus	<100 CFU/g	Method: Sacco M10 (1)
Coagulase positive staphylococci*	<10 CFU/g	Method: Sacco M11(2)
Enterobacteriaceae	<10 CFU/g	Method: Sacco M2 (3)
Escherichia coli	<1 CFU/g	Method: Sacco M27 (4)
*Listeria monocytogenes**	Not detected in 25 g	Method: Sacco M13 (5)
Moulds & yeasts	<10 CFU/g	Method: Sacco M3 (6)
Salmonella spp*	Not detected in 25 g	Method: Sacco M12 (7)

** Analysed on regular basis. All analytical methods are available upon request.*
(1)ISO 7932; (2)ISO 6888-1-2; (3)ISO 21528-1-2; (4)ISO11866-1-2/IDF 170-1-2; (5)ISO 11290-1-2; (6)ISO 6611/IDF 94; (7)ISO 6785/IDF 93.

GMO

The microbial strains are not genetically modified (GMO) in accordance with the European Directive 2001/18/EC. The strains are isolated from natural sources. The raw materials used are also GMO free in accordance with Regulation (EC) No. 1829/2003 and Regulation (EC) No. 1830/2003. Statement available upon request.

Allergens

The raw materials used are generally based on dairy ingredients. All materials are free of the following components and their derivates: peanut, tree nut, sesame, egg, fish, shellfish, mollusc, crustacean, sulphite, cereals containing gluten, celery, mustard, soy and lupine. Statement available upon request.

Safety information Material Safety Data Sheet available on www.saccosrl.it

Certificate

Lot certificate available upon request.

ISO Kosher approval

Sacco S.r.l. is UNI EN ISO 9001:2008 certified since 1998, ISO 22000:2005 and FSSC 22000 certified since 2014. Sacco cultures are generally Kosher approved except for surface ripening cultures.

Service

Please contact your distributor for guidance and instructions for your choice of culture and processing. Information about additional package sizes and sales units is also available upon request.

Liability

This information is based on our knowledge trustworthy and presented in good faith. No guarantee against patent infringement is implied or inferred.

Annexe 03: (préparation du bouillon nutritif)

-pesez une quantité de 13g de la poudre déshydraté de bouillon nutritifs.
- décharger les dans un Bicher et remplis avec d'eaux distillées jusqu'a obtention d'un litre
-ajouter un barreau d'agitation dans le bicher pour mélanger et dissoudrez complètement la poudre dans le mélange.
-stériliser à l'autoclave à121°c pendant 15 minutes

Annexes 04 : (préparation d'acide sulfurique 1N)

Eau distillé	500 ml
$KMnO_4$	1.58g

Annexes 05 : (préparation duNoah 1 N)

Préparation de 100 ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium de concentration molaire 0,02 M.

Masse à prélever

La masse *m* de produit à prélever est donnée par la formule : $m = \frac{C \times V \times M}{1000}$

Dans laquelle : ***C*** est la concentration molaire (en mol/L) de la solution

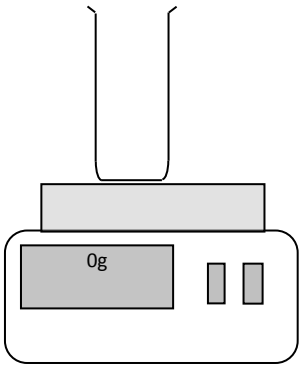
M est la masse molaire (en g/mol)

V est le volume de la solution (en ml)

Le Calcule de 0.8 g d'hydroxyde de sodium à prélever pour réaliser 100 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire 0,02 M

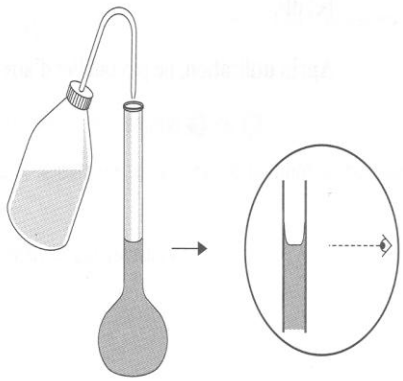
Pesée

- Mettre la balance électronique en route.
- Poser un bécher sur le plateau.
- Appuyer sur le bouton « tare » pour que la balance affiche 0 g.
- Introduire 0,8 g d'hydroxyde de sodium dans le bécher à l'aide de la spatule



Préparation de la solution

- Poser le bécher sur la paillasse et ajouter environ 50 ml d'eau distillée.
- Agiter la solution pour dissoudre le produit.
- Verser la solution dans une fiole jaugée de 100 ml.
- Rincer le bécher avec l'eau distillée et verser le contenu dans la fiole.
- Compléter la fiole jusqu'au trait de jauge avec la pissette d'eau distillée.
- Fermer la fiole avec un bouchon et agiter pour rendre homogène la solution.



Annexes 06 : (Milieu Gélose nutritif GN)

Tryptone	5g
Extrait de viande	3g
Agar agar bactériologique	12g
Eau distillée	1000ml