

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences Alimentaires

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Contrôle de qualité et analyse des aliments



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Réf :

Mémoire de Fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Valorisation d'un co-produit de l'industrie sucrière mélasse :
production de l'acide lactique**

Présenté par :

BOUZIDI Lydia & HAYOUNE Diana

Soutenu le : **03/07/2024**

Devant le jury composé de :

Mme. BRAHMI. F
Mme. ACHAT. S
Mme. BOUBECHIR. K

Présidente
Encadrante
Examinatrice

Année universitaire : 2023 / 2024

Remerciements

Nous remercions Allah, le tout puissant pour nous avoir donné la santé

Et le courage d'avancer et d'achever ce travail.

Nous remercions sincèrement Mme BRAHMI Fatiha de nous avoir fait l'honneur de présider notre jury, ainsi que Mme BOUBECHIR Kahina pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous exprimons notre respect et notre gratitude à Mme ACHAT Sabiha pour avoir accepté de nous encadrer et pour avoir suivi notre travail avec bienveillance.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à tout le personnel du complexe CEVITAL de laboratoire de la base sucre 3500 pour leur suivi, leurs enseignements avisés et surtout leur modestie et simplicité, un grand merci.

Un remerciement particulier à Mme IMADALOU Nadia l'ingénieure de laboratoire de technologie alimentaire de l'université.

Un merci sincère est adressé à nos enseignants qui nous ont accompagnés tout au long du premier semestre.

Sans oublier de remercier les personnes les plus importantes dans nos vies, nos très chers parents, frères et sœurs pour leur soutien et leur amour inconditionnels. Un immense merci à vous.

Enfin un merci venant du fond du cœur à toute personne ayant contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.



Lydia et Diana



Dédicace

Je tiens à dédier ce modeste travail à

Moi-même et ma binôme Lydia sans qui je n'aurais rien pu faire.

Mes très chers parents mes piliers, qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont toujours

Encouragé.

Mes sœurs que j'adore Souad, Ghania et Naima et mon grand frère Mohammed Tahar et

Mon beau-frère Adel.

Et surtout pour mon cher Idir.

Mes meilleurs amies Imane, Lamia, Kenza, Tinhinane et Amina MA et mes cousines Yasmine et Nawal qui m'ont tenu la main et m'ont soutenu.

Mes adorables neveux et nièces

Toute notre promo M2 CQAA. Des personnes superbes avec qui j'ai passé de très beaux moments.

Toute personne ayant un jour croisé mon chemin et m'ayant fait grandir et

Me construire.

Diana



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

Moi-même et ma binôme Diana sans qui je n'aurais rien pu faire.

*Mes très chers parents mes piliers, qui ont toujours été là pour moi et qui
m'ont toujours*

Encouragé.

Ma petite sœur adorée Roza et mon petit frère Imad.

*Mes chères tantes Wahiba, Nabila, Sabiha, Souad et Kahina et leurs
époux et leurs enfants*

*Mes meilleurs amies Imane, Lamia, Kenza, Cylia, Baya et Lydia qui
m'ont tenu la main et m'ont soutenu*

*Toute notre promo M2 CQAA. Des personnes superbes avec qui j'ai passé
de très beaux moments.*

*Toute personne ayant un jour croisé mon chemin et m'ayant fait grandir
et*

Me construire.

Lydia

Sommaire

Introduction	1
I. Mélasse.....	3
1.1. Définition	3
1.2. Composition de la mélasse	3
1.3. Caractéristiques physico-chimiques	3
1.4. Utilisations de la mélasse	4
II. Généralités sur l'acide lactique.....	5
2.1. Définition	5
2.2. Propriétés physico-chimiques	5
2.3. Utilisations de l'acide lactique.....	6
2.4. Production d'acide lactique	6
III. Agents fermentaires.....	8
3.1. <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i>	8
3.2. <i>Streptococcus salivarius subsp thermophilus</i>	8
3.3. Avantage d'utilisation des deux souches.....	9
IV. Fermentation lactique.....	10
4.1. Définition	10
4.2. Paramètres de la fermentation lactique	10
Partie pratique	11
I. Matériel et méthodes	11
1.2.1. Analyses physico-chimiques	12
1.2.1.1 Détermination du Brix (ICUMSA)	12
1.2.1.2 Détermination de polarisation (ICUMSA)	12
1.2.1.3 Détermination de la pureté.....	13
1.2.1.4 Détermination du pH (ICUMSA).....	13
1.3. Extraction de l'invertase	13
1.3.1. Dosage de l'invertase	14
1.4. Prétraitement enzymatique de la mélasse.....	16
1.5. Procédés de fermentations	16
1.5.1.1. Milieu de culture	16
1.5.1.2 Préparation de la préculture	18
1.5.1.3. Préparation de l'inoculum	19
1.6. Dosage de l'acide lactique	19
1.6.1. Principe de l'HPLC	19
1.6.2. Procédure expérimentale.....	20

II. Résultats et discussion.....	22
2.1. Analyses physico-chimiques de la mélasse.....	22
2.1.1. Brix	22
2.1.2. Polarisation.....	23
2.1.3. Pureté.....	23
2.1.4. pH.....	24
2.2. Extraction de l'invertase	25
2.2.1. Dosage de l'invertase	25
2.3. Procédés de fermentations	27
2.3.1. Culture pré-enrichie	27
2.3.2. Inoculum (milieu de fermentation)	27
3. Taux d'acide lactique produit.....	28
Conclusion.....	30

Références bibliographiques

Résumé

Listes d'abréviations

D- : dextrogyre.

FDA : Food and Drug administration.

GRAS : Generally Recognize As Safe.

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance.

ICUMSA : International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis.

ISO : International Organizations for Standardization.

L+ : lévogyre.

MRS : Man Rogosa Sharpe.

MS : matière sèche.

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NaOH : hydroxyde de sodium.

P/p : poids/poids

rpm : rotation par minute.

TFA : acide trifluoracétique.

UV : ultraviolet.

Liste des tableaux

Titres	Pages
Tableau I : Composition générale de la mélasse de canne à sucre.	3
Tableau II : Les propriétés physico- chimiques de l'acide lactique.	7
Tableau III : Production d'acides lactiques à base de différents types de mélasses.	8
Tableau IV : Composition du milieu MRS.	21
Tableau V : Les caractéristiques des souches lactiques utilisées.	22
Tableau VI : Concentration d'acide lactique obtenue par HPLC.	33

Liste de figures

Titres	Pages
Figure 01 : Structure tridimensionnelle des deux formes isomériques de l'acide lactique.	6
Figure 02 : Morphologie électronique de <i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> .	10
Figure 03 : Morphologie électronique de <i>Streptococcus salivarius subsp thermophilus</i>	11
Figure 04 : La réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase.	16
Figure 05 : Evolution du Brix de la mélasse en fonction des jours.	26
Figure 06 : Evolution de la polarisation de la mélasse en fonction des jours.	27
Figure 07 : Evolution de la pureté de la mélasse en fonction des jours.	28
Figure 08 : Evolution du pH de la mélasse en fonction des jours.	28
Figure 09 : Courbe d'étalonnage du glucose.	29
Figure 10 : Photographie représentative de la charge bactérienne obtenue.	31
Figure 11 : Photographie de la culture bactérienne dans le bouillon à base de la mélasse.	32

Introduction

Introduction

La mélasse est un liquide épais de couleur brune et de consistance sirupeuse, qui est le résidu de l'extraction du sucre lorsqu'il n'est plus possible d'obtenir commodément du saccharose à partir de ce dernier pour une simple cristallisation (**Mordenti et al. 2021**). La mélasse, un coproduit du processus de fabrication du sucre, comprend généralement environ 50 % des sucres totaux, Il est actuellement utilisé comme matière première dans la production d'alcool et de levure et également comme aliment pour animaux mais aussi comme matière première dans la production d'acide lactique (**Vidra et al. 2017**).

L'industrie de raffinage de sucre (CEVITAL) est un secteur de l'industrie agroalimentaire de Bejaia (Algérie), ayant une capacité de production de 50 tonnes de mélasse par jour, équivalent à 18000 tonnes par an, elle exporte 5800 tonnes de mélasse chaque trois mois. Le but de ce complexe agroalimentaire est de produire une mélasse conforme, de point de vue, réglementation et qualité commerciale, pour répondre à la concurrence nationale et internationale et assurer une amélioration via les normes internationales ISO 9001 et ISO 22000.

L'acide lactique est un produit très utilisé dans l'industrie alimentaire comme additifs (SIN270) en tant qu'un anti oxygène, acidifiant ou exhausteur de goût. Sa production peut être dérivée des procédés de fermentation à partir des résidus agro-industrie contenant des sucres ou des précurseurs du sucre comme la mélasse. L'acide lactique peut être également utilisé comme un acide poly lactique (PLA) qui est un polymère entièrement biodégradable utilisé dans l'alimentation pour l'emballage et pour remplacer les sacs en plastiques (**Vidra et al. 2017**), qui sont jusqu'à présent distribués dans les commerces. Le marché de l'acide lactique a atteint

3,82 milliards de dollars en 2020 et croit à un taux de 18% annuellement. Cependant, la production industrielle d'acide lactique n'a pas suivi la demande du marché (**Djukic - Vukovic et al. 2012**). Ce produit est donc un choix intéressant pour une valorisation de la mélasse de la Canne à sucre.

Ce travail s'inscrit dans ce cadre précis et consiste à utiliser la mélasse en tant que substrat de fermentation pour la production d'acide lactique en culture mixte en utilisant *Lactobacillus Delbrueckii subsp bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. Des essais de fermentation ont été menés à l'échelle laboratoire afin de vérifier la faisabilité d'utilisation simultanée de ces deux cultures mixtes.

L'ensemble de ce travail est reparti en plusieurs parties :

- dans la première partie, nous aborderons les différentes connaissances bibliographiques en rapport avec la mélasse, l'acide lactique avec sa production et les souches lactiques.
- nous développerons dans le deuxième volet le matériel et l'ensemble des techniques et méthodes utilisées pour l'étude.
- la troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus dans cette étude.
- une conclusion et des perspectives sont données à la fin du présent travail.

Synthèse

Bibliographique

I. Mélasse

1.1. Définition

La mélasse, un coproduit constitué par le résidu sirupeux recueilli lors de la fabrication du sucre de canne ou de sucre brut après la dernière phase de cristallisation du sucre, à partir duquel aucun sucre supplémentaire ne peut être cristallisé de manière rentable. Elle est également connue sous le nom de mélasse finale (**Jamir et al., 2021**). Elle se présente sous la forme d'un liquide visqueux et homogène, incristallisable de couleur marron foncé à noir, d'odeur et de saveur caractéristiques de réglisse (**Vidra et al., 2017**).

1.2. Composition de la mélasse

Les principaux composants de la mélasse sont le saccharose (30-35%), le fructose et le glucose (10- 25%) et les composés non sucrés (2-3%). La mélasse contient des quantités infimes de vitamines et plusieurs minéraux (**Tableau I**).

Tableau I : Composition générale de la mélasse de canne à sucre (**Jamir et al., 2021**).

Composition	Valeur %
Saccharose	29_40
Eau	17_25
Glucose	4_14
Cendre	17_15
Potassium	4_50.83
Calcium	08_15
Magnésium	1_14
Sodium	0.09_9
Protéine	0.5_4.5
Sulfates	2.24_9.91
Acides aminés	0.3_1.5
Acides non azotés	1.5_8
Cire, stérols et phosphatides	0.1_1
Biotine	0.1_2ppm, 036mg /Kg
Riboflavine	1_6ppm, 1.8mg/Kg

1.3. Caractéristiques physico-chimiques

- **Densité** : La densité réelle de la mélasse est de l'ordre de 1.4 à 1.5, densité supérieure à celle de l'eau (**Hugot, 1987**).
- **Viscosité** : La viscosité de la mélasse augmente rapidement lorsque sa température diminue mais aussi avec le Brix et la proportion d'air emprisonnée sous forme des fines bulles dans la mélasse (**Hugot, 1987 ; Bernard et al. 1991**).

- **Teneur en air** : La mélasse contient des bulles d'air. Le volume d'air est d'ordre de 15% de volume de la mélasse. Elle est plus élevée que la mélasse est visqueuse (**Hugot, 1987 ; Kulkarni, 1996**).
- **Pureté** : La pureté de la mélasse est le rapport exprimé en pourcentage (%) entre le taux de sucre et la matière sèche (Brix) (**Larpent et Larpent, 1985**).
- **Brix** : Le Brix est la concentration en matières sèches dissoutes (saccharose, réducteurs, acides, sels, etc.) (**Curtin, 1983 ; Caldwell, 1997 ; Benne, 1999**).

1.4. Utilisations de la mélasse

La mélasse de sucre de canne est un sous-produit de l'extraction du sucre qui trouve de nombreuses applications dans divers domaines en raison de sa richesse en sucres et en minéraux (**Fao, 2018**).

1.4.1. Alimentation animale

La mélasse est couramment utilisée dans les rations alimentaires pour le bétail. Elle améliore la palatabilité des aliments et sert de source d'énergie rapide grâce à sa teneur élevée en sucres fermentescibles. Elle est particulièrement efficace pour améliorer la qualité de la fermentation dans les ensilages, comme le montre une étude sur l'ensilage de luzerne, où l'ajout de mélasse a amélioré la qualité de la fermentation et la stabilité à long terme du fourrage (**Luo et al., 2021**).

1.4.2. Agriculture

La mélasse est utilisée comme engrais organique et amendement du sol. Elle apporte des nutriments essentiels et favorise la croissance des micro-organismes bénéfiques dans le sol. Des recherches ont montré que l'application de solutions de mélasse sur les cultures peut augmenter la présence d'insectes bénéfiques et réduire les infestations de parasites, contribuant ainsi à une meilleure santé des plantes et à une réduction des dommages causés par les ravageurs (**Piewthongngam et al., 2009**).

1.4.3. Production de bioéthanol

En tant que matière première riche en sucres fermentescibles, la mélasse est utilisée dans la production de bioéthanol. Elle offre une alternative économique et durable aux autres sources de sucre utilisées dans les processus de fermentation pour la production de carburant (**Luo et al., 2021**).

1.4.4. Alimentation humaine

La mélasse est utilisée comme édulcorant naturel dans diverses préparations culinaires. Elle enrichit les produits alimentaires en vitamines et minéraux, offrant une alternative nutritive aux sucres raffinés. Elle est couramment utilisée dans la fabrication de pains, de biscuits, de sauces et de marinades pour son goût distinctif et ses bienfaits nutritionnels (**Piewthongngam et al., 2009**).

II. Généralités sur l'acide lactique

2.1. Définition

L'acide lactique (ou acide α -hydroxypropanoïque), est l'acide carboxylique le plus largement produit dans la nature, il est le principale composant de tous les produits laitiers acidifiés. Il a été isolé pour la première fois en 1780 par le chimiste suédois, Carl Wilhelm Scheele et sa production industrielle a commencé aux Etats-Unis (**Bayitse, 2015 ; Martinez et al., 2013 ; Narayanan, 2004**). De nos jours, 90% de la production d'acide lactique est fournie par fermentation microbienne (**Komesu., 2017**). 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 d'alcool (**Narayanan et al., 2004**).

2.2. Propriétés physico-chimiques

L'acide lactique se présente sous deux formes isomères (**Fig.01**), la forme (D-) et la forme (L+). L'isomère acide L(+) lactique est préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de L-lactate déshydrogénase dans l'être humain, tandis que l'isomère acide D(-) Lactique est parfois dangereux au métabolisme humain et peut causer une acidose et une décalcification (**Ren, 2011**).

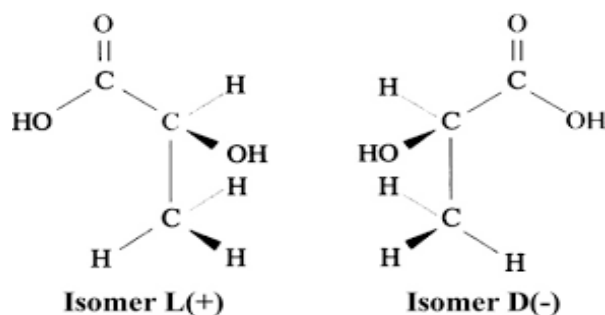


Figure 01 : Structure tridimensionnelle des deux formes isomériques de l'acide lactique (**Martinez et al., 2013**).

Les principales propriétés physico-chimiques de l'acide lactique sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Les propriétés physico-chimiques de l'acide lactique (**Komesu, 2017**)

Propriétés	Unités	Valeurs
Poids moléculaire	(mol)	90.08
Point de fusion	(°C)	52.8(D) - 53.0(L)
Capacité thermique à 20°C	J/mol. °C	190(DL)
Point de l'ébullition	°C (à 1.87kpa)	103(L et D)
Densité solide	g.mol-1 (20°C)	1.33
Densité liquide	g.mol-1 (20°C)	1.057
Aspect physique	/	Solution aqueuse

2.3. Utilisations de l'acide lactique

L'acide lactique est un acide organique naturel principalement utilisé dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (**Sirisansaneeyakul et al., 2007; Zhang et al., 2007**). Il est classé comme GRAS (Generally Recognize As Safe) pour son utilisation comme additif alimentaire par la FDA (Food and Drug Administration) (**Martinez et al, 2013**). La production biotechnologique d'acide lactique s'avère intéressante pour la production de poly lactique acide (PLA), un polymère biodégradable qui a été utilisé comme une alternative au plastic biodégradable dérivé de matières pétrochimiques (**Bayitse, 2015**).

2.4. Production d'acide lactique

Les différentes méthodes de production d'acide lactique à base de différents types de mélasses, rapportées dans la littérature sont illustrées dans le tableau III.

Tableau III : Production d'acides lactiques à base de différents types de mélasses.

Matrice	Méthodologie	Références
Mélasse de canne à sucre	Agents ferments : <i>Enterococcus faecalis</i> RKY, ; Par fermentation discontinue Taux de production de l'acide lactique : 95.7 g/l avec un rendement de 94.9%.	(Wee et al., 2004)
Mélasse de la betterave	Agents ferments : <i>Lactobacillus delbrueckii</i> NCIMB8130. Par fermentation statique en flacons agité.	(Kotzamanidis et al ., 2002)

	Taux de production de l'acide lactique : 88.0 g/l	
Mélasses et de bagasse de Canne	<i>Lactobacillus plantarum</i> Par Fermentation dans un bouillon MRS. Taux de production de l'acide lactique : 88.0 g/l.	(Oliveira et al., 2016)
Mélasses de canne à sucre	Agents ferments : <i>Lactobacillus casei</i> M-15 Par méthodologie de surface de réponse (RSM). Taux de production de l'acide lactique : 88.0 g/l.	(Chaisu et al., 2014)
Mélasses de canne à sucre	Agents ferments : <i>Lactobacillus plantarum</i> LMISM6 Dans un milieu MRS Conception expérimentale de plackett- burman. Taux de production de l'acide lactique : 90.2g/l.	(Coelho et al., 2011)

III. Agents fermentaires

3.1. *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii, sous espèce *bulgaricus* est une souche de bactérie lactique bien connue pour son application importante dans l'industrie alimentaire. En termes de morphologie, il est en forme de bâtonnet, immobile, aux extrémités arrondies et en comparaison avec les autres membres de sa famille observés au microscope, plus fin et plus long (Fig.02). La température de croissance optimale était de 45°C, les températures de croissance minimale et maximale sont respectivement 22°C et 55°C (Mehramouz et al., 2022).

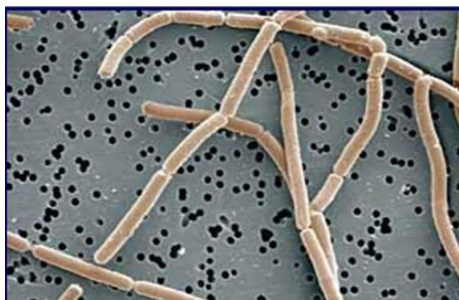


Figure 02 : Morphologie électronique de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* (Pang et al., 2017)

Cette bactérie est homofermentaire (plus de 90% des produits de fermentation est de l'acide lactique), dépourvue de couleur et est un organisme anaérobie facultatif, et parmi les différents sucres, ceux-ci sont capables de fermenter le lactose. Elle est considérée comme une bactérie thermophile et son importance est due à sa puissance particulière pour être utilisée dans l'industrie alimentaire, en particulier dans la production de produits laitiers fermentés comme le yaourt (Mehramouz et al., 2022)

3.2 *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*

Streptococcus salivarius subsp thermophilus est une coque à Gram positif, non mobile (Fig.03). Elle est trouvée dans les laits fermentés et les fromages (Dellagio et al, 1994). Cette souche est l'une des bactéries lactiques homofermentaires les plus précieuses, qui depuis longtemps, est largement utilisée comme ferment pour la production de produits laitiers fermentés, *Streptococcus thermophilus* est la seule espèce de streptocoque largement utilisée dans les fermentations alimentaires. Elle est utilisée comme semence avec *Lactobacillus delbrueckii* pour produire du yaourt depuis des milliers d'années. Parallèlement *S. thermophilus* a également été utilisé dans divers produits artisanaux et industriels, par exemple certains fromages et laits fermentés (Cui et al., 2016).

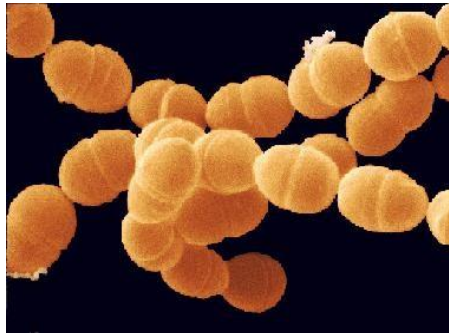


Figure 03 : Morphologie électronique de *Streptococcus salivarius subsp Thermophilus* (Cheurfi & Aouidat, 2021).

Le taux d'acidification des souches dépend de leur capacité d'utilisation des sucres. Un certain nombre de travaux indiquent que l'utilisation du glucose, du lactose et du fructose par *S. thermophilus* est une caractéristique commune à toutes les études existantes, tandis que l'utilisation du galactose, du mannose, du saccharose, du maltose, raffinose a été variable (Cui et al., 2016).

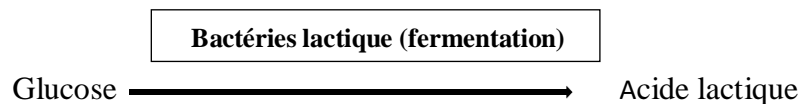
3.3. Avantage d'utilisation des deux souches

L'utilisation de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* présente de nombreux avantages au niveau industriel, notamment en termes de rapidité et d'efficacité de la fermentation, de qualité sensorielle des produits, de bénéfices pour la santé. Leur capacité à produire des composés aromatiques, à améliorer la digestibilité et à prolonger la durée de conservation des produits ont fait des choix idéaux pour l'industrie alimentaire, en particulier pour la fabrication de yaourts et autres produits laitiers fermentés (Tamime & Robinson, 1999).

IV. Fermentation lactique

4.1. Définition

La fermentation lactique est un processus catabolique, une fermentation anaérobie, ayant comme point de départ la glycolyse, qui produit un acide, de l'acide lactique servant à réoxyder le NADH. La fermentation décompose le glucose en l'absence d'oxygène (**Nelson et al., 2008**).



4.2. Paramètres de la fermentation lactique

- **Oxygène**

Plusieurs travaux ont démontré que la présence d'oxygène dissous dans le milieu affecte négativement la production de l'acide lactique (**Hasnaoui, 2022**) et ils ont démontré que l'oxygène dissous interfère seulement avec la relation symbiotique entre *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* (**Horiuchi & Sasaki, 2012**).

- **Température**

La température de croissance optimale varie de 35 à 42 °C pour *S. thermophilus* et de 43 à 46°C pour *L. bulgaricus* (**Hasnaoui, 2022**).

- **pH**

Les deux bactéries croissent bien dans un intervalle de pH de 5,5 à 6,5. Une baisse de pH affecte la prolifération des deux bactéries en culture simple (**Hasnaoui, 2022**).

- **Temps d'incubation**

La période d'incubation de 48 heures a été généralement utilisée pour la production d'acide lactique en utilisant différentes cultures de lactobacilles (**Panesar et al., 2010**).

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

1.1 Objectif de l'étude

Le but principal de ce travail est la valorisation de la mélasse de sucre de canne, en tant que matière première pour la production d'acide lactique à partir d'une culture mixte (ferment lactique du yaourt), en suivant la démarche expérimentale citée ci-dessous :

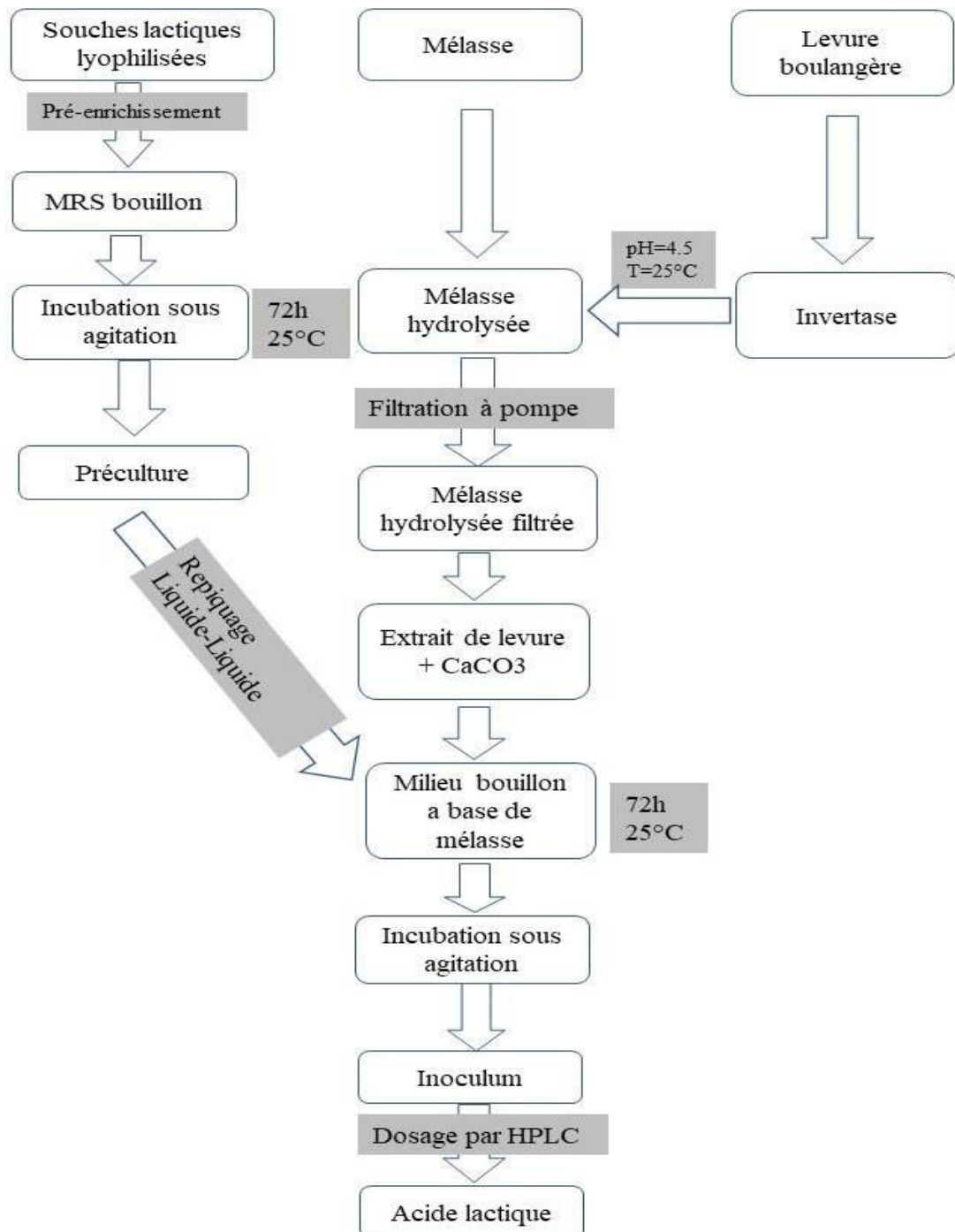


Figure 04 : Schéma récapitulatif de la production de l'acide lactique à partir de la mélasse.

1.2. Mélasse

La mélasse utilisée dans cette étude, est produite par la raffinerie de sucre roux au niveau du complexe CEVITAL de Bejaïa, à partir de sucre de canne qui a subi des étapes du raffinage dans de différentes sections notamment, affinage et refonte, carbonatation, filtration, décoloration, concentration et cristallisation. Après cette dernière étape la mélasse est récupérée en filtrant le sirop de sucre restant. Ce processus permet de séparer les cristaux de sucre des résidus de mélasse donnant ainsi la mélasse comme coproduit de la production de sucre cristallisé.

1.2.1. Analyses physico-chimiques

La matière première utilisée dans ce travail a été d'abord analysée. L'ensemble des analyses physico-chimiques sont effectués aux niveaux des laboratoires de la raffinerie de sucre « CEVITAL », notamment le Brix, la polarisation, pureté et pH.

- **Matériels et réactifs**

- Mélasse, papier filtre et terre diatomée (infusoire).
- Erlenmeyer, Entonnoir, Diluteur automatique mené d'une balance de précision, Agitateur mécanique, Réfractomètre, Polarimètre et pH-mètre.

1.2.1.1 Détermination du Brix (ICUMSA)

La détermination de la teneur massique en matière sèche des produits sucriers est réalisée par mesure de l'indice de réfraction au moyen d'un réfractomètre thermostat à 20°C, en suivant les étapes ci-après :

Pour commencer l'analyse, il est essentiel de peser entre 15 à 25 grammes du l'échantillon à étudier à l'aide d'une balance de haute précision. Ensuite, une dilution 10 (p/p) est effectuée à l'aide d'un diluteur automatique, suivie d'une agitation vigoureuse jusqu'à ce que la substance soit complètement dissoute et uniformément homogénéisée. Le mélange est ensuite filtré à travers du papier filtrant contenant de la terre de diatomée pour séparer les particules solides de la solution liquide. Une fois filtrée, une quantité spécifique de la solution est placée dans le réfractomètre pour obtenir une lecture numérique précise de la valeur recherchée.

Le résultat est exprimé comme suit :

$$\text{Brix (\%)} = \text{lecture au réfractomètre} \times \text{le facteur de la dilution}$$

1.2.1.2 Détermination de polarisation (ICUMSA)

La rotation optique d'une solution du sucre déterminé par polarimètre, est l'effet produit par sa teneur en saccharose en déviant le faisceau lumineux.

Après avoir filtré la solution, verser un certain volume dans le polarimètre et lire la polarisation à l'échelle de 26g.

Les résultats s'expriment comme suit :

$$\text{Pol (\%)} = K \times \text{Lecture au polarimètre} \times \text{le facteur de la dilution}$$

1.2.1.3 Détermination de la pureté

La mesure est définie par le rapport entre la teneur en saccharose et la teneur en matière sèche (MS) Comme suit :

$$\text{Pureté} = (\text{Teneur en saccharose} / \text{Teneur en matière sèche}) \times 100 = (\text{Pol/Brix}) \times 100$$

1.2.1.4 Détermination du pH (ICUMSA)

Le principe est la mesure du potentiel d'Hydrogène de la solution. L'électrode est neutralisée avec des solutions tampon, rincée avec de l'eau distillée et immergée dans la solution de mélasse. La lecture est prise après 5min quand le potentiel d'équilibre à travers l'électrode est atteint.

1.3. Extraction de l'invertase

Il s'agit de l'extraction d'une enzyme endocellulaire. Les méthodes d'extraction s'avèrent non spécifique et se basent toutes sur la rupture membranaire en assurant cependant l'intégrité des protéines enzymatiques (**Kati, 2012**).

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme source d'enzyme pour cette étude. Elle est achetée dans le commerce. L'extraction de l'invertase se fait par plasmolyse suivie d'autolyse assistée, c'est-à-dire de digestion par enzyme protéolytique (**Minifie, 1999**).

• Matériel et réactifs

- Levure boulangère, tampon citrate 0.1M (pH 6), eau distillée et saccharose (0.1M).
- Mortier, agitateur, pH mètre, centrifugeuse et bac à glace.

• Mode opératoire

L'extraction de l'invertase consiste en la succession des étapes ci-après, selon la méthode décrite par Akardere et al. (2010) :

Pour préparer l'extrait enzymatique de levure boulangère, commencer par broyer 30 g de levure dans un mortier avec 60 ml d'eau distillée et 6 ml de solution tampon citrate 0.1 M (pH 6) pendant environ 5 minutes. Couvrir le mélange et agiter jusqu'à ce que la levure soit complètement dissoute. Ensuite, immerger le broyat homogénéisé dans un bain de glace pendant 10 minutes pour inhiber l'activité enzymatique.

Une fois refroidi, récupérer 10 ml du broyat et centrifuger à 4500 tours par minute pendant 30 minutes. Après la centrifugation, le mélange se sépare en deux phases : le culot et le surnageant qui contient l'extrait enzymatique, notamment l'invertase. Utiliser une micropipette pour récupérer soigneusement le surnageant, qui sera utilisé pour les analyses ou les études enzymatiques ultérieures.

1.3.1. Dosage de l'invertase

L'invertase ou β -fructofuranosidase, est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose (Fig.04). Dans l'industrie agro-alimentaire, elle est utilisée comme additif alimentaire (stabilisant E1103), car elle évite la cristallisation du sucre notamment dans les confiseries. D'origine naturelle, elle est synthétisée par la levure de boulangerie (Kieliszek et al. 2017).

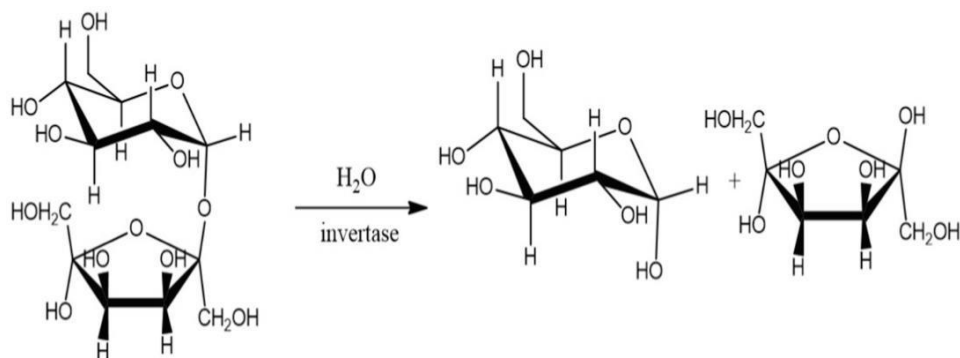


Figure 04 : La réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase (Kulshrestha, Tyagi, Sindhi, & Yadavilli, 2013).

- Après l'extraction de cette enzyme microbienne (l'invertase des cellules de levure), nous

avons procédé à sa quantification.

- **Matériel et réactifs**

- Invertase (échantillon à tester), saccharose, tampon acétate (pH 4.5, 0.1 M), acide 3,5-dinitro Salicylique (DNS), solution standard de glucose et eau distillée.
- Bain-marie, Spectrophotomètre, tubes à essai, pipettes et micropipettes.

- **Protocole expérimental**

Le dosage de l'enzyme est effectué par la mesure de sucres réducteurs obtenus par hydrolyse du saccharose sous l'action de l'invertase, par la technique de **Rochalska et al. (2011)** :

- a. Réaction enzymatique**

Pour démarrer l'expérience, mélanger 0.5 ml de solution tampon acétate (pH 4.5, 0.1 M) avec 0.5 ml de solution de saccharose 0.1 M, puis ajouter 0.1 ml d'invertase. Incuber ce mélange à 37°C pendant 10 minutes pour permettre la réaction enzymatique.

Une fois l'incubation terminée, chauffer les tubes contenant le mélange dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour stopper la réaction enzymatique. Ensuite, refroidir rapidement les tubes sous un jet d'eau froide, assurant ainsi l'arrêt complet de l'activité enzymatique et préservant les échantillons pour les analyses ultérieures **Rochalska et al. (2011)**.

- b. Détection glucose**

Les groupements aldéhydiques réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse des liaisons 1-2 glycosidiques du saccharose par l'invertase réduisent le DNS, tout en formant un produit coloré (**Rochalska et al. 2011**), pour cela :

Après avoir arrêté la réaction enzymatique en refroidissant les tubes, ajouter 1 ml de solution DNS à chaque échantillon. Ensuite, diluer chaque échantillon avec 10 ml d'eau distillée pour assurer que la concentration est approprié pour la mesure de l'absorbance.

Une fois diluée, mesuré l'absorbance des échantillons à une longueur d'onde de 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

c. Courbe d'étalonnage

Pour déterminer la concentration en sucres de la préparation enzymatique, il faut tracer une courbe d'étalonnage, en utilisant le glucose comme sucre étalon.

Pour préparer les solutions standards de glucose de concentrations connues (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/ml), commencez par préparer chaque solution en dissolvant la quantité appropriée de glucose dans de l'eau distillée pour obtenir les concentrations désirées.

Une fois les solutions standards préparées, ajoutez 1 ml de solution DNS à chaque standard. Chauffez ensuite les tubes dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour développer la réaction colorimétrique. Après chauffage, refroidissez rapidement les tubes sous un jet d'eau froide pour arrêter la réaction enzymatique et assurer la stabilité de la couleur.

Enfin, diluez chaque échantillon de la même manière que les échantillons expérimentaux, en ajoutant 10 ml d'eau distillée à chaque tube standard. Assurez-vous que toutes les mesures sont prises dans des conditions similaires pour une comparaison précise des absorbances à 540 nm, ce qui permettra de construire une courbe d'étalonnage pour quantifier la concentration de glucose dans les échantillons expérimentaux.

a. Expression des résultats

Une unité d'activité saccharidique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit une μ mole de sucres réducteurs (équivalent en invertase), par minute, dans un ml de l'enzyme pure et dans les conditions expérimentales mentionnées ci-dessus. L'activité de l'invertase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité invertase} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{\text{concentration de glucose} \left(\mu \frac{mol}{ml} \right) \times \text{volume} (ml)}{\text{temps de réaction} (min) \times \text{volume d'enzyme} (ml)}$$

1.4. Prétraitement enzymatique de la mélasse

- **Matériel et réactifs**

- Mélasse, invertase, NaOH (20%).
- Agitateur magnétique, thermomètre, pH-mètre, erlenmeyer et micropipette.

- **Mode opératoire**

Pour commencer la préparation de la mélasse hydrolysée, verser 4.4 g de mélasse dans un Erlenmeyer de 200 ml. Ajouter ensuite 33 ml d'invertase à pH 4.5 et maintenir la température à 25°C avec agitation continue pendant 30 minutes pour permettre l'hydrolyse enzymatique.

Après l'hydrolyse, ajuster le pH du mélange à 6 en ajoutant lentement de la solution de NaOH à 20%, tout en surveillant le pH avec un pH-mètre.

Pour stériliser la mélasse hydrolysée, utiliser une filtration à pompe en utilisant du papier filtre de 0.45 µm pour éliminer les particules et les micro-organismes indésirables. Cette méthode assure la stérilité de la solution tout en préservant les composants hydrolysés nécessaires pour les applications ultérieures.

1.2. Procédés de fermentations

Le milieu de culture utilisé au cours de notre fermentation est à base de mélasse de sucre de canne. Avant son utilisation comme substrat de fermentation, cette mélasse a été prétraitée par l'invertase, selon le protocole proposé par Vidra et al. (2017).

1.2.1. Collection et préparation de milieu de culture

1.5.1.1. Milieu de culture

Le Milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS) est utilisé pour la croissance des souches fermentaires, Lactobacilles et streptocoques (De Man et al. 1960), la composition de milieu MRS est illustrée dans le Tableau IV.

Tableau IV : Composition du milieu MRS.

Composition	Concentration (g/l)
Polypeptone	10
Extrait de viande	10
Extrait autolytique de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Phosphate dipotassique	2
Acétate de sodium	5
Citrate d'ammonium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

• Principe

Les diverses peptones, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles. Le Tween 80 (mélange d'esters oléiques) est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique permet de stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne. Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants incluant les streptocoques fécaux et les moisissures (Balla, 2011 ; De Man et al., 1960)

- **Matériel et réactifs**

- Poudre déshydratée et eau distillée.
- Erlenmeyer, flacons, Agitateur magnétique mené d'une plaque chauffante et Autoclave.

- **Mode opératoire**

Pour préparer le milieu déshydraté, mettre en suspension 55,3 g du milieu dans 1 litre d'eau Distillée. Agiter doucement jusqu'à ce que le milieu soit complètement dissous, en chauffant Légèrement si nécessaire pour faciliter la dissolution. Une fois le milieu complètement Dissous, répartir la solution dans des flacons stériles et adaptés à la quantité désirée. Assurez-vous que chaque flacon est correctement étiqueté pour identifier le contenu et la date de préparation. Pour assurer la stérilité, stériliser les flacons scellés à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Cette procédure de stérilisation garantit l'élimination des micro-Organismes indésirables et permet une conservation sûre du milieu préparé pour une utilisation en culture microbiologique.

1.5.1.2 Préparation du préculture

Les souches utilisées dans notre étude sont *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* (**Tableau IV**). Elles sont revivifiées par deux repiquages sur milieu MRS liquide, puis elles sont conservées à 4°C (**Vidra et al. 2017**).

Tableau IV : Les caractéristiques des souches lactiques utilisées.

<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus</i> et <i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i>	
Taille	30X50 U
Couleur	blanc cassé a légèrement rouge ou brun
Format	FD-DVS
Forme	granulat
Stockage	< -18°C (< 0°F)
Durée de vie	Au moins 24 mois à compter de la date de production si stocké suivant les Recommandations. A +5°C (41°F) la durée de vie est au minimum de 6 Semaines.
Utilisation	Cette culture est destinée à produire des yaourts

• Matériels et réactifs

- Poudre lyophilisé (ferments lactiques), eau physiologique.
- Agitateur vortex, tube à essais stérilisés, micropipette, coton cardé.

• Méthode expérimentale

Pour débiter la préparation des ferments, peser avec précision 1 g de poudre lyophilisée dans un environnement stérile. Transférer cette quantité dans un tube stérile et ajouter 10 ml d'eau physiologique. Agiter vigoureusement à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que la poudre soit Complètement homogénéisée pour former la solution mère.

À partir de la solution mère, prélever 1 ml et le transférer dans un nouveau tube stérile. Ajouter 9 ml d'eau physiologique pour obtenir la première dilution. Répéter cette étape en prélevant 1 ml de la première dilution et en le transférant dans un autre tube stérile. À nouveau, ajouter 9 ml d'eau Physiologique pour obtenir la deuxième dilution.

Ensuite, prélever 100 µl de la deuxième solution diluée et l'ajouter dans un flacon contenant le milieu MRS bouillon. Une fois les flacons préparés, les couvrir avec du coton cardé pour permettre une aération tout en empêchant la contamination.

Pour favoriser la croissance des ferments, incuber les flacons à 45 °C pendant 72 heures dans Un incubateur à agitation réglé à une vitesse de 200 rpm (rotations par minute). Cette condition Optimale d'incubation garantit des conditions favorables à la prolifération des ferments dans le Milieu MRS bouillon, prêtant ainsi à leur utilisation pour des études ou applications Microbiologiques ultérieures.

-

1.5.1.3. Préparation de l'inoculum

Dans l'étude de la fermentation, la préparation de l'inoculum, afin de produire de l'acide lactique, a été réalisée selon la méthode décrite par **Vidra et al. (2017)**. Le milieu contenait : 10g de l'extrait de levure, 41.5g de carbonate de calcium CaCO_3 et 107.5ml de la mélasse hydrolysée.

- **Matériels et réactifs**

- Extrait de levure, carbonate de calcium CaCO_3 , mélasse hydrolysée, eau distillée.
- Bec bunsen, coton cardé, micropipette, embouts et autoclave.

- **Protocole expérimental**

Après la préparation du pré-inoculum, verser le contenu dans un erlenmeyer et ajouter 500 ml d'eau distillée. Agiter doucement jusqu'à ce que la dissolution soit complète, en chauffant si nécessaire jusqu'à ce que le mélange atteigne l'ébullition

Une fois le mélange homogène, répartir équitablement l'homogénat dans des flacons stériles.

Assurez-vous que chaque flacon est correctement étiqueté pour une identification claire.

Pour garantir la stérilité, stériliser les flacons scellés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Ensuite, pour le repiquage liquide-liquide, prélever 150 μl des cultures pré-inoculum et les transférer dans des flacons contenant le milieu de culture à base de mélasse. Couvrir chaque flacon avec du coton cardé pour permettre une aération tout en empêchant la contamination.

Incuber les flacons à 45°C pendant 3 jours dans un incubateur à agitation, réglé à une vitesse de 200 rpm. Cette condition optimale d'incubation favorise la croissance des cultures dans le milieu de culture à base de mélasse, préparant ainsi les cultures pour des expériences ou des analyses microbiologiques subséquentes.

1.3. Dosage de l'acide lactique

La quantification de l'acide lactique produit a été effectuée par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), selon la méthode d'**Armaforte et al. (2006)**.

1.3.1. Principe de l'HPLC

L'HPLC est une technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants dans un mélange. L'analyse des acides lactiques par HPLC repose sur l'utilisation d'une colonne spécialisée et d'une phase mobile appropriée pour séparer l'acide lactique des autres composants présents dans l'échantillon (**Armaforte et al., 2006**).

- **Matériel et réactifs**

- Système HPLC avec pompe, détecteur (UV-visible), injecteur automatique, thermostat pour contrôler la température de la colonne, logiciel d'acquisition de données HPLC.
- Colonne de chromatographie adaptée à l'analyse de composés organiques acides (par exemple, une colonne à phase inverse (C18)).
- Solvants HPLC : acétonitrile et eau, avec ajout éventuel d'acide trifluoroacétique (TFA).
- Échantillons contenant de l'acide lactique.
- Standards de référence d'acide lactique pour la calibration et la quantification.

1.3.2. Procédure expérimentale

a. Préparation de la phase mobile

Préparez un mélange approprié de solvants HPLC (acétonitrile et eau) dans les proportions nécessaires pour obtenir une bonne séparation des composants acides comme l'acide lactique. Ajoutez un petit pourcentage de TFA pour améliorer la séparation.

b. Préparation de l'échantillon

Préparez l'échantillon en le dissolvant dans un solvant compatible avec la phase mobile. (Acétonitrile/eau appropriée), afin de dissoudre l'acide lactique et le mettre ainsi en solution. Filtrez l'échantillon pour éliminer les particules et les contaminants.

c. Configuration de système HPLC

Assurez que le système HPLC est correctement configuré et calibré pour l'analyse de l'acide lactique. Configurez les paramètres de la pompe pour la vitesse d'écoulement de la phase mobile recommandée.

d. Équilibrage de la colonne

Équilibrez la colonne en laissant passer la phase mobile à travers elle pendant un certain temps (30 minutes) à la vitesse de flux spécifiée dans les conditions d'équilibrage. Cela stabilise la colonne et assure des conditions de séparation cohérentes.

e. Injection de l'échantillon

Utilisez l'injecteur automatique pour injecter une petite quantité d'échantillon (20 µL) dans le système HPLC. Assurez-vous que l'injection est précise pour des résultats reproductibles.

f. Séparation des composants

La phase mobile transporte l'échantillon à travers la colonne de chromatographie. L'acide lactique et d'autres composants acides seront séparés en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire (C18) et la phase mobile (acétonitrile/eau avec TFA).

g. Détection et enregistrement des données :

Les composants séparés, y compris l'acide lactique, sont détectés à mesure qu'ils sortent de la colonne par le détecteur HPLC (UV-visible), qui convertit les signaux en données numériques qui sont enregistrées et analysées par le logiciel HPLC.

h. Analyse des résultats :

Analysez les pics chromatographiques obtenus pour identifier et quantifier l'acide lactique. Comparez les temps de rétention et les aires des pics avec ceux des standards de référence d'acide lactique.

II. Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

L'utilisation de la mélasse comme substrat de fermentation lactique nécessite au préalable une étude physicochimique. La connaissance de cette composition est nécessaire pour vérifier par la suite l'adéquation du milieu de culture.

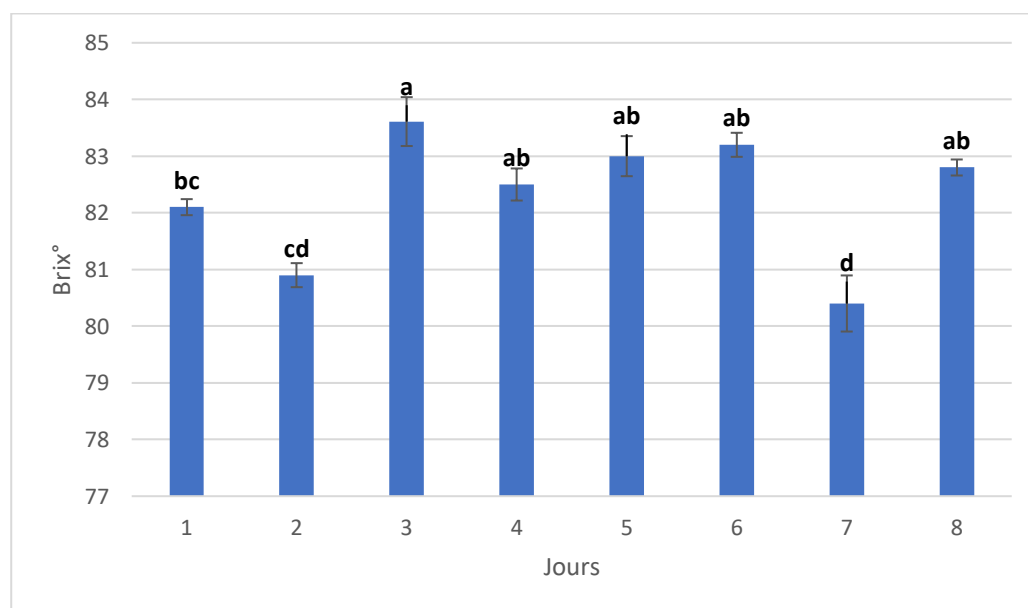
2.1. Analyses physico-chimiques de la mélasse

Avant de commencer cette étude, réalisée au niveau de la raffinerie de sucre du complexe CEVITAL, nous avons d'abord analysé la mélasse et suivie sa qualité au cours du raffinage pendant huit jours.

Les résultats des différents paramètres physico-chimiques de la mélasse sont :

2.1.1. Brix

Brix est un outil essentiel pour mesurer la concentration en sucre dans les liquides, basé sur la réfraction de la lumière à travers la solution (**Benne, 1999**). Les résultats obtenus après mesure du Brix de la mélasse de sucre de canne sont présentés dans la figure 05.



Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différent ($p < 0.05$) et ($a > b > c > d > e$)

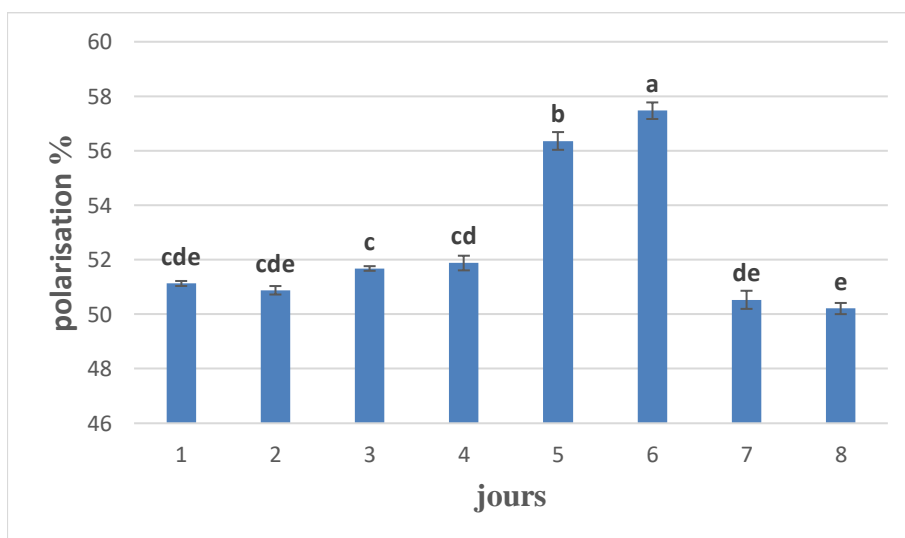
Figure 05 : Evolution du Brix de la mélasse en fonction des jours.

Les valeurs du Brix oscillent principalement entre 80° et 83°, qui sont en accord avec les normes de CEVITAL, assurant une concentration stable de sucre, une exception notable a été observée le jour 3, où une augmentation du degré de Brix a été enregistrée. En revanche cette dernière

N'influence pas la qualité de la mélasse. Ainsi, la stabilité générale des valeurs de Brix garantit une qualité constante et conforme aux attentes de l'entreprise.

2.1.2. Polarisation

La polarisation de la mélasse exploite les propriétés optiques du saccharose pour mesurer sa concentration dans la solution de la mélasse à l'aide d'un polarimètre (ICUMSA). Les résultats observés durant les huit jours sont comme suit (Fig.06) :



Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différents ($p < 0.05$) et ($a > b > c > d > e$)

Figure 06 : Evolution de la polarisation de la mélasse en fonction des jours.

Les valeurs varient autour de 50% à 56% de polarisation, ces résultats montrent ainsi que ces données sont toutes supérieures à la norme minimale de 40, indiquant une conformité générale aux attentes.

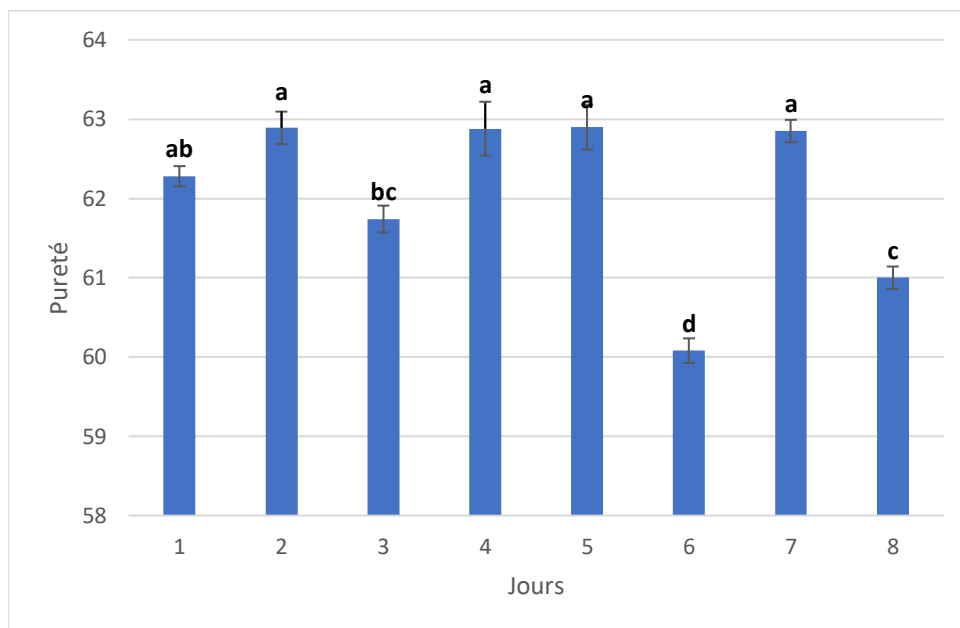
2.1.3. Pureté

La qualité de la mélasse est fréquemment évaluée à l'aide de la polarisation spécifique, qui mesure la concentration en saccharose. Une valeur élevée de polarisation spécifique indique une concentration plus élevée en saccharose, ce qui est généralement associé à une meilleure qualité du produit (Larpent et Larpent, 1985).

Les valeurs enregistrées après l'analyse de la pureté de la mélasse sont groupées dans la figure 07. Les niveaux de pureté demeurent relativement constants, variant de 61% à 63%. Ces résultats indiquent que toutes les mesures de pureté se situent dans l'intervalle normatif de 55% à 63%, ainsi les valeurs observées sont conformes aux normes.

A l'issue de l'ensemble des données physicochimiques recueillies, nous pouvons dire que l'objectif de ce complexe agroalimentaire est atteint en vue de la production d'une mélasse,

conforme à la qualité commerciale, pour répondre à la concurrence nationale et internationale et assurer une amélioration via les normes internationales ISO 9001 et ISO 22000.

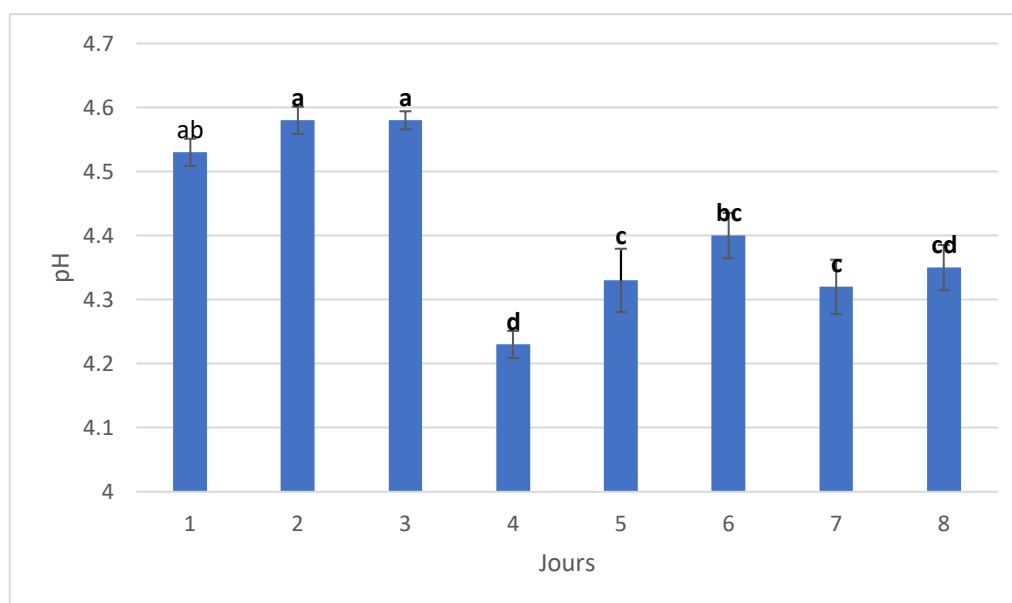


Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différent ($p < 0.05$) et ($a > b > c > d > e$)

Figure 07 : Evolution de la pureté de la mélasse en fonction des jours.

2.1.4. pH

Le pH de la mélasse peut être ajusté pour optimiser les conditions de fermentation ou pour répondre aux exigences spécifiques du processus de production. Cela peut être fait en utilisant des agents alcalins ou acides selon les besoins. Les résultats de la mesure du pH sont présentés dans la (**Fig.08**) :



Les niveaux non connectés par la même lettre sont significativement différent ($p < 0.05$) et ($a > b > c > d > e$)

Figure 08 : Evolution du pH de la mélasse en fonction des jours.

Les valeurs du pH de la mélasse sont supérieures à 4 ce qui est parfaitement en accord avec les normes exigées qui sont au minimum de 4.

2.2. Extraction de l'invertase

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est l'organisme de choix pour la production de l'invertase elle est communément appelée levure de boulangère et donc la souche principale utilisée pour la production d'invertase commerciale.

Selon le protocole expérimental appliqué, nous avons recueilli un surnageant légèrement ambré, il s'agit l'extrait brut d'invertase, qui est conservé à 4°C. Ainsi nous avons réussi à extraire environ 60 ml d'invertase brute à partir de 180 g de levure boulangère. Ce processus implique probablement une extraction enzymatique efficace en dépit des conditions moins favorables.

2.2.1. Dosage de l'invertase

L'invertase est extraite à partir de la levure boulangère et son activité est déterminée par mesure de la quantité de sucres réducteurs (fructose + glucose) formés au cours de la réaction.

À l'aide de la courbe d'étalonnage (**Fig.09**), nous avons pu calculer la concentration du glucose dans l'extrait brut d'invertase, cette quantité est de l'ordre de 2,57 mg/ml.

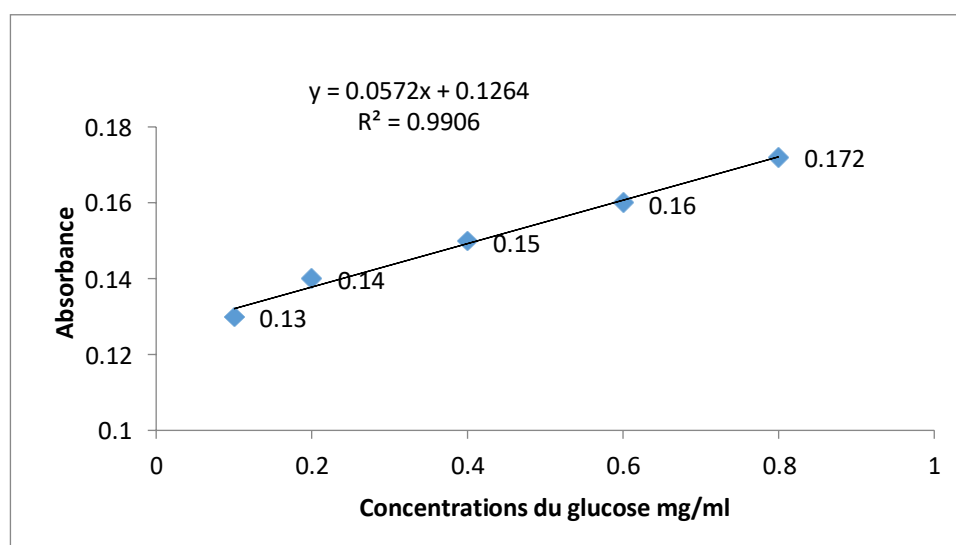


Figure 09 : Courbe d'étalonnage du glucose

- **Activité de l'invertase :**

L'étude de l'activité enzymatique de l'invertase microbienne (enzyme des cellules de levure) constitue une exploration cruciale des facteurs influençant sa performance catalytique. Dans cette recherche, nous avons évalué l'activité spécifique de l'invertase à pH 4.5 et 25°C, obtenant une mesure de 25.7 U/mg de protéine.

Ce résultat est contextualisé par des recherches antérieures, notamment celles **d'Essel & Osei (2014)**, qui ont rapporté une activité significativement plus élevée à pH 4.9 et à 37°C, atteignant 130 U/mg de protéine, en utilisant l'invertase pure. De plus, **Benmedjahed & Bengrine (2017)** ont identifié un optimum d'activité enzymatique à pH 4.6, avec une température optimale de 60°C pour l'hydrolyse du saccharose.

La différence notable dans les activités enzymatiques pourrait être attribuée aux différences de pH et de température appliqués. En effet, Les protéines en solution portent des charges électrostatiques dues à l'ionisation des groupements des radicaux (R-NH⁺ 3 et R-COO⁻) des acides aminés. Ces groupements ionisés peuvent modifier l'activité de l'enzyme. Ainsi du fait que les ions H⁺ jouent un rôle essentiel dans l'ionisation de ces groupements, par conséquent l'activité enzymatique va varier en fonction du pH (**Landoulsi et al., 2006**).

La température a un effet direct aussi, en accélérant les vitesses des réactions enzymatiques, fournissant ainsi l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière de l'énergie d'activation. D'autre part, la température a un impact sur la structure tridimensionnelle des enzymes, entraînant progressivement la dénaturation et la désactivation (**Wallach, 1997**). Donc, le choix de la température d'analyse est extrêmement important puisque la façon dont les enzymes réagissent à une température donnée est fondamentale (**Daniel et Danson, 2013**).

Toutefois notre résultat indique que l'invertase présente une activité catalytique même à pH 4.5 et à 25°C, ce qui peut être avantageux pour certaines applications industrielles où des conditions économiques sont préférées.

Indépendamment de l'utilisation du même enzyme invertase de *Saccharomyces cerevisiae*, les variations dans les conditions expérimentales, les optima d'activité, la composition des substrats, les méthodes de mesure et la variabilité biologique peuvent influencer les résultats d'activité enzymatique observés dans les différentes études. Ces aspects soulignent l'importance de standardiser les méthodes expérimentales et de déterminer avec précision les conditions optimales pour une utilisation efficace de l'invertase dans l'industrie.

2.3. Procédés de fermentations

2.3.1. Culture pré-enrichie

L'enrichissement des bactéries est une étape essentielle visant à concentrer, isoler et étudier les populations bactériennes. Nous avons enrichi les souches lyophilisées de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* dans le milieu MRS déjà préparé, afin de produire des inocula de haute qualité et en quantité suffisante.

Après l'incubation pendant 72h à 45°C, nous avons enregistré une prolifération bactérienne très importante au fond du flacon qui s'est manifestée par un virage de couleur du bouillon MRS (**Fig.10**).



Figure 10 : Photographie représentative de la charge bactérienne obtenue.

Ce résultat indique une croissance des bactéries lactiques notamment *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* qui sont les deux ferments spécifiques du yaourt.

2.3.2. Inoculum (milieu de fermentation)

Après l'étape du pré-enrichissement ou de préculture sur le milieu MRS, des souches homolactiques utilisées dans cette étude (*Lactobacillus delbrueckii* et *Streptococcus thermophilus*), nous avons procédé au repiquage liquide-liquide dans un milieu à base de mélasse hydrolysée. En effet, l'utilisation de la mélasse en tant que substrat de fermentation pour la production d'acide lactique, a nécessité au préalable un prétraitement enzymatique, en ajoutant l'invertase brute extraite précédemment pour hydrolyser le saccharose (Fructose plus glucose) contenue dans ce co-produit.

Dans les conditions favorables à la croissance des bactéries lactiques probiotiques et après une incubation pendant 72 heures à 45°C dans une atmosphère appauvrie en oxygène avec une micro aération, les résultats obtenus de la culture sur un bouillon à base de mélasse se traduisent par l'apparition d'un trouble et un virage de couleur de milieu (**Fig.11**).



Figure 11 : Photographie de la culture bactérienne dans le bouillon à base de la mélasse

Les résultats obtenus ont montré clairement que la mélasse de sucre de canne, est favorable à la croissance et à la production d'acide lactique par *Lactobacillus delbrueckii subsp Bulgaricu* et *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*.

3. Taux d'acide lactique produit

La quantité d'acide lactique produite par la mélasse étudiée a été obtenue par la technique d'HPLC. Les concentrations du lactate correspondantes aux trois milieux de fermentation préparés (échantillons), sont présentées dans le tableau V.

Tableau V : Concentrations d'acide lactique obtenues par HPLC.

Les échantillons	Concentration d'acide lactique (g/l)
Echantillon 1	10.14 ± 0.17
Echantillon 2	8.77 ± 0.54
Echantillon 3	11.38 ± 0.49

Ces résultats montrent que la concentration d'acide lactique varie légèrement d'un échantillon à l'autre : l'échantillon 3 présente la concentration la plus élevée (11.38 g/l), suivi

de l'échantillon 1 (10.14 g/l), tandis que l'échantillon 2 affiche la concentration la plus basse (8.77 g/l). Les variations observées indiquent que la production d'acide lactique peut varier entre les échantillons, ce qui pourrait être influencé par différents facteurs tels que la viabilité des ferments, l'activité enzymatique des ferments, la micro-distribution des nutriments dans les substrats.

Nos résultats sont complètement différents, largement inférieurs, de ceux rapportés dans la littérature, ayant travaillé sur la même matrice (mélasse de sucre de canne) :

- **Wee et al. (2004)** ont montré que la production maximale d'acide lactique par *Enterococcus faecalis* est obtenue avec 95.7 g/l de glucose.
- **Chaisu et al. (2014)** ont optimisé la production de lactate par *Lactobacillus casei* et ils ont révélé que la quantité maximale de ce produit était de 88 g/l.
- **Oliveira et al. (2016)** ont utilisé l'agent fermentaire de *Lactobacillus plantarum* et ils ont montré une productivité maximale de l'acide lactique de 88 g/l de sucre. Cependant un autre travail de **Coelho et al. (2011)**, a enregistré une concentration plus élevée d'acide lactique (94,8 g/L) en utilisant la même souche lactique (*L. plantarum*)

Cette différence est probablement due à l'approche testée dans notre étude qui est la culture mixte de ferments lactiques à savoir : *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*. En effet, la capacité d'un agent fermentaire à produire du lactate dépend de la souche lactique sélectionnée, mais aussi de la nature de la culture (pure ou mixte) (**Vidra et al. 2017**).

Ces données mettent en évidence que les études antérieures ont opté pour une optimisation plus poussée des différents composants de fermentation tels que la mélasse concentrée, le pH, la température et le Tween 80, spécifiquement pour favoriser la croissance et la production d'acide lactique. De ce fait, notre étude suggère qu'il y a encore un potentiel d'amélioration dans les conditions de fermentation utilisant, en explorant d'autres paramètres et ajustements pour augmenter le rendement en acide lactique à partir de la mélasse.

Conclusion

Conclusion

La valorisation de la mélasse de sucre de canne pour la production d'acide lactique s'avère être une approche prometteuse pour le développement durable et la bioéconomie. Cette recherche a démontré que la mélasse, un co-produit abondant et économique de l'industrie sucrière, peut être efficacement utilisée comme substrat pour la fermentation lactique.

Les analyses physico-chimiques de la mélasse de sucre de canne du complexe agro-alimentaire de CEVITAL ont montré que les paramètres testés tels que le Brix, la polarisation, la pureté et le pH étaient globalement conformes aux normes ICUMSA.

Un extrait brut d'invertase a été obtenu en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'activité spécifique de cette enzyme microbienne (pH 4.5 et 25°C), a été ainsi déterminée atteignant 25.7 U/mg de protéine

Le prétraitement enzymatique de la mélasse par l'invertase a permis de présenter un milieu de culture favorable pour la prolifération des bactéries lactiques, grâce à sa richesse en glucose comme source de carbone. L'addition d'extrait de levure a été utilisée comme source d'azote.

En effet, la production d'acide par *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* a été analysée dans cette étude. Les deux souches étaient capables de se croître dans la mélasse de canne. La concentration d'acide lactique ainsi produite après 72 heures était de **11.38 ± 0.49g/L**. Les productivités atteintes sont beaucoup plus faibles que celles rapportées par d'autres travaux de recherches, mais cela est probablement lié à la quantité insuffisante d'invertase pour l'hydrolyse complète du saccharose.

Les résultats montrent que la mélasse de sucre de canne est une matière première viable pour la production industrielle d'acide lactique, contribuant ainsi à la réduction des coûts de production et à la diminution de l'impact environnemental. De plus, cette valorisation offre une solution innovante pour l'utilisation des déchets agricoles, renforçant l'économie circulaire.

Notre étude ne constitue qu'une base initiale, elle nécessiterait des optimisations supplémentaires pour rivaliser avec les performances de production d'acide lactique. Pour cela il serait intéressant d'élargir cette modeste recherche par :

- ⇒ L'amélioration des conditions de fermentation pour maximiser la production d'acide lactique, en ajustant des paramètres tels que le pH, la température et la concentration en substrat ;
- ⇒ L'exploration d'autres cultures lactiques pures ou mixtes pour comparer l'efficacité de la fermentation et les rendements en acide lactique.
- ⇒ La fabrication d'emballages biodégradables à partir d'acide lactique qui représente une avancée significative vers des solutions d'emballage plus durables et écologiques.

Références Bibliographiques

Références bibliographies

A

Akardere, E., Özer, B., Çelem, E. B., & Önal, S. (2010). Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast. *Separation and Purification Technology*, 72(3), 335-339.

Armaforte, E., Carri, S., Ferri, G., & Caboni, M. F. (2006). High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. *Journal of Chromatography A*, 1131(1-2), 281-284.

B

Balla, A. (2011). Effets de quelques cryoprotecteurs sur la conservation d'une souche d'intérêt isolée à partir du lait camelin. Magister de Biologie. Université Kasdi Merbah Ouargla, Faculte Des Sciences de la Nature et de La Vie et Des Sciences de La Terre et de L'univers, 91 p.

Bayitse, R. (2015). Lactic acid production from biomass: prospect for bioresidue utilization in Ghana: technological review. *International journal of applied science and technology*, 5(1).

C

Chaisu, K., Charles, A. L., Guu, Y.-K., Yen, T.-B., & Chiu, C.-H. (2014). Optimization lactic acid production from molasses renewable raw material through response surface methodology with *Lactobacillus casei* M-15. *APCBEE procedia*, 8, 194-198.

Cheurfi, S., & Aouidat, F. Z. (2021). L'étude de l'utilisation des bactéries lactiques genre *Lactobacillus* dans l'industrie agro-alimentaire.

Coelho, L., De Lima, C., Rodovalho, C., Bernardo, M., & Contiero, J. (2011). Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28, 27-36.

Cui, Y., Xu, T., Qu, X., Hu, T., Jiang, X., & Zhao, C. (2016). New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1701.

D

Datta, R., & Henry, M. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(7), 1119-1129.

Djukić-Vuković, A. P., Mojović, L. V., Vukašinović-Sekulić, M. S., Rakin, M. B., Nikolić, S. B., Pejtin, J. D., & Bulatović, M. L. (2012). Effect of different fermentation parameters on L-lactic acid production from liquid distillery stillage. *Food chemistry*, 134(2), 1038-1043.

F

Fao. (2018). Food and agriculture organization of the United Nations. *Rome*, URL: <http://faostat.fao.org>, 403-403.

D

Daniel, R. M., & Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS letters*, 587(17), 2738-2743.

De Man, J. D., Rogosa, D., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 23(1), 130-135.

Dellagio F., De Rossart H., Torrianis S., Curik M. Janssens D. 1994. Caractérisation générale des bactéries lactiques. Technique et documentation. Lorica (Ed.), 1, p25-116.

H

Hasnaoui, I. (2022). Étude de l'impact du lactosérum électro-activé sur la croissance des bactéries lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* et leur pouvoir antibactérien contre *Salmonella enterica*. Université Laval.

Horiuchi, H., & Sasaki, Y. (2012). Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of dairy science*, 95(6), 2904-2909.

J

Jamir, L., Kumar, V., Kaur, J., Kumar, S., & Singh, H. (2021). Composition, valorization and therapeutical potential of molasses: a critical review. *Environmental Technology Reviews*, 10(1), 131-142.

K

Kieliszek, M., Kot, A. M., Błażej, S., Gientka, I., & Kieliszek, R. (2017). Invertase—a review of properties, uses, and methods of detection. *BioMed Research International*, 2017, 1-11.

Komesu, A., De Oliveira, J. A. R., Da Silva Martins, L. H., Maciel, M. R. W., & Maciel Filho, R. (2017). Lactic acid production to purification: a review. *BioResources*, 12(2), 4364-4383.

Kotzamanidis, C., Roukas, T., & Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 441-448.

L

Landoulsi, J., Marconnet, C., Dagbert, C., Pulvin, S., Richard, C., & Féron, D. (2006). Mécanisme enzymatique en milieux faiblement chlorurés : influence de la glucose oxydase sur le comportement électrochimique de l'acier inoxydable AISI 316L. *Matériaux & Techniques*, 94, 477-483.

Luo, R., Zhang, Y., Wang, F., Liu, K., Huang, G., Zheng, N., & Wang, J. (2021). Effects of sugar cane molasses addition on the fermentation quality, microbial community, and tastes of alfalfa silage. *Animals*, 11(2), 355.

M

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & De Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.

Mehramouz, B., Sepehrtaghizadeh, E. Z., Ganbarov, K., Moaddab, S. R., Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2022). Molecular and Phenotypic Characterization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* with Antimicrobial Properties as a Potential Probiotic and Postbiotic.

Mordenti, A. L., Giaretta, E., Campidonio, L., Parazza, P., & Formigoni, A. (2021). A review regarding the use of molasses in animal nutrition. *Animals*, 11(1), 115.

N

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 7(2), 167-178.

Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*: Macmillan.

O

Oliveira, R., Maciel Filho, R., & Rossel, C. V. (2016). High lactic acid production from molasses and hydrolysed sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Transactions*, 50, 307-312.

P

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., & Kosseva, M. (2010). Production of L (+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 53, 219-226.

Pang, X., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Ma, C., Yang, Y., . . . Lv, J. (2017). Identification and functional validation of autolysis—associated genes in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC BAA-365. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1367.

Piewthongngam, K., Pathumnakul, S., & Setthanan, K. (2009). Application of crop growth simulation and mathematical modeling to supply chain management in the Thai sugar industry. *Agricultural Systems*, 102(1-3), 58-66.

R

Rochalska, M., Orzeszko-Rywka, A., & Czaplak, K. (2011). The content of nutritive substances in strawberries according to cropping system. *J. Res. Appl. Agric. Engin*, 56(4), 84-86.

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

T

Tamime, A., & Robinson, R. (1999). *Yoghurt: science and technology*.

V

Vidra, A., Tóth, A. J., & Németh, Á. (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery*, 2(1), 13-16.

W

Wallach, J. (1997). *Les enzymes.*, Nathan, Paris, pp 4, 6-8.

Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., & Ryu, H.-W. (2004). Utilization of sugar molasses for economical L (+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), 568-573.

Z

Zhang, Z. Y., Jin, B., & Kelly, J. M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical engineering journal*, 35(3), 251-26

Résumé

Cette étude démontre que la mélasse, un co-produit abondant et économique de l'industrie sucrière, peut être efficacement utilisée comme substrat pour la fermentation lactique. Les analyses physico-chimiques de la mélasse de sucre de canne ont montré que les paramètres testés tels que le Brix, la polarisation, la pureté et le pH étaient globalement conformes aux normes ICUMSA. Un extrait brut d'invertase a été obtenu en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* et l'activité spécifique de cette enzyme microbienne (pH 4.5 et 25°C), a été ainsi déterminée atteignant 25.7 U/mg de protéine. Le prétraitement de la mélasse par l'invertase a permis d'avoir un milieu de culture favorable pour la prolifération des bactéries lactiques, grâce à sa richesse en glucose comme source de carbone. En effet, la production d'acide lactique par *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* et *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* a été analysée dans cette étude. Les deux souches étaient capables de se croître dans la mélasse de canne. La concentration d'acide lactique ainsi produite après 72 heures était de 11.38 ± 0.49 g/L.

Mots clés : Mélasse, invertase, acide lactique, souches lactiques, fermentation, valorisation.

Abstract

This study demonstrates that molasses, an abundant and economical co-product of the sugar industry, can be effectively used as a substrate for lactic acid fermentation. Physico-chemical analyses of cane sugar molasses showed that parameters tested such as Brix, polarization, purity and pH were broadly in line with ICUMSA standards. A crude extract of invertase was obtained using *Saccharomyces cerevisiae* yeast, and the specific activity of this microbial enzyme (pH 4.5 and 25°C) was determined to be 25.7 U/mg protein. Pre-treatment of molasses with invertase provided a favorable culture medium for the proliferation of lactic acid bacteria, thanks to its high glucose content as a carbon source. Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* and *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus* was analyzed in this study. Both strains were able to grow in cane molasses. The lactic acid concentration produced after 72 hours was 11.38 ± 0.49 g/L.

Key Words: Molasses, invertase, lactic Acid, lactic strains, fermentation, valorization.