

**Sommaire.**

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1. Synthèse bibliographique</b>	<b>3</b>
1.1. Le yaourt	3
1.1.1. Définition du yaourt	3
1.1.2. Historique	4
1.1.3. Matières premières et ingrédients	4
1.1.4. Caractéristiques générales des bactéries du yaourt	7
1.1.4.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	7
1.1.4.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7
1.1.5. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt	7
1.1.5.1. Production d'acide lactique	7
1.1.5.2. Activité protéolytique	8
1.1.5.3. Activité aromatique	8
1.1.5.4. Activité texturante	9
1.1.6. Comportement associatif des deux souches	9
1.1.7. Facteur influençant la proto-coopération des deux souches	9
1.1.8. Principaux facteurs influençant le métabolisme des bactéries lactiques	11
1.1.8.1. Facteurs physiques	11
1.1.8.2. Facteurs chimiques	12
1.1.8.3. Facteurs microbiologiques	12
1.1.9. Les grandes étapes de la fabrication des yaourts	12
1.1.9.1. Standardisation et homogénéisation du mélange	13
1.1.9.2. Le traitement thermique	13
1.1.9.3. Fermentation lactique	14
1.1.9.4. Conditionnement et stockage	14
1.1.10. Structure et comportement rhéologique des yaourts	14
1.2. Modélisation	15
1.2.1. Introduction à la modélisation	15
1.2.2. Définition d'un processus	15
1.2.3. Définition des modèles.	16
1.2.4. Buts d'une modélisation	16
1.2.5. Les étapes de la conception d'un modèle	16
1.2.6. Modélisation par la méthode des plans d'expériences	17
1.2.7. Méthode de criblage ou Screening	18
1.2.7.1. Définition de l'objectif de l'étude	19
1.2.7.2. Définition de la/les réponse(s) caractérisant l'objectif	19
1.2.7.3. Choix d'une stratégie expérimentale	19
1.2.7.4. Définition des facteurs	19
1.2.7.5. Définition du domaine expérimental	20
1.2.7.6. Construction du plan d'expériences	21
1.2.7.7. Expérimentation	21
1.2.7.8. Analyse globale des résultats d'essais	21
1.2.7.9. Analyse mathématique des résultats d'essais	22
1.2.7.10. Analyse statistique du modèle	22

1.2.7.11. Analyse graphique du modèle	22
1.2.7.12. Validation du modèle et des informations obtenues	23
1.2.8. Méthode de surface de réponse	23
1.2.8.1. Notion de surface de réponse	24
1.2.8.2. Définition du ou des objectif(s) de l'étude	24
1.2.8.3. Définition de la/les réponse(s) caractérisant l'objectif	25
1.2.8.4. Choix d'une stratégie expérimentale	25
1.2.8.5. Définition des facteurs	25
1.2.8.6. Définition des niveaux	25
1.2.8.7. Codage de la matrice d'expériences	26
1.2.8.8. Définition du domaine expérimental	26
1.2.8.9. Définition du modèle empirique	26
1.2.8.10. Construction du plan d'expériences	27
1.2.8.11. Analyse statistique du modèle	28
1.2.8.12. L'analyse du modèle dans sa globalité	28
1.2.8.13. Analyse graphique du modèle	30
1.2.8.13.1. Graphe d'adéquation du modèle	30
1.2.8.13.2. Surfaces de réponse	30
1.2.8.13.3. Courbes iso-réponse	31
1.2.8.14. Validation du modèle et des informations obtenues	31
1.2.8.15. Recherche des conditions optimales	32
<b>2. Matériel et méthodes</b>	<b>33</b>
2.1. Isolement et purification des bactéries de Yaourt	33
2.1.1. Echantillonnage de yaourt	33
2.1.2. Milieux de culture	33
2.1.2.1. Le milieu M17	33
2.1.2.2. Le milieu MRS	34
2.1.2.3. Lait écrémé	34
2.1.3. Dénombrement et isolement de bactéries lactiques de yaourt.	34
2.1.4. Détermination et caractérisation des isolats	35
2.1.4.1. Examen micro- et macroscopique	35
2.1.4.2. Testes biochimiques et physiologiques	35
2.1.5. Conservation des souches	35
2.1.6. Cinétique de croissance bactérienne.	35
2.2. Optimisation de la fabrication de yaourt par l'application des plans d'expériences	36
2.2.1. Application de la méthode de criblage	36
2.2.1.1. Définition des objectifs et des réponses	36
2.2.1.2. Dosage de l'acide lactique	36
2.2.1.3. Définition des facteurs	37
2.2.1.4. Définition du domaine expérimental	37
2.2.1.5. Construction du plan d'expérience	38
2.2.1.6. Expérimentation	38
2.2.2. Application de la méthode de surface de réponse	39
2.2.2.1. Définition des facteurs	39
2.2.2.2. Définition du domaine expérimental	39

2.2.2.3. Méthode d'analyse mathématique des résultats	41
2.2.2.4. Méthode d'analyse graphique du modèle	42
<b>3. Résultats et discussion</b>	<b>43</b>
3.1. Isolement et caractérisation des bactéries	43
3.2. Caractérisation des souches obtenues	43
3.2.1. Examen macroscopique	43
3.2.2. Examen microscopique	43
3.2.3. Recherche de la Catalase	43
3.2.4. Croissance sur milieu additionné de NaCl	44
3.2.5. Température de croissance	44
3.3. Cinétique de croissance bactérienne	45
3.4. Optimisation de la fabrication de yaourt par l'application des plans d'expériences	48
3.4.1. Résultats après application de la méthode de criblage	48
3.4.2. Analyse globale des résultats	48
3.4.3. Analyse statistique des résultats d'essais	48
3.4.4. Analyse graphique des résultats	49
3.5. Application de la méthode de surface de réponse	51
3.5.1. Analyse globale des résultats	51
3.5.2. Analyse mathématique et statistique des résultats d'essais	52
3.5.3. Analyse graphique des résultats (graphe d'estimation des effets)	56
3.5.4. Analyse graphique des résultats par l'utilisation des surfaces de réponses	57
3.6. Analyse statistique des deux modèles	60
3.7. Analyse graphique des deux modèles	60
3.8. Recherche des conditions optimales	62
<b>Conclusion</b>	<b>64</b>

Références bibliographiques

**Liste des tableaux.**

<b>Tableau 1.</b>	Principaux composants du lait écrémé.	<b>4</b>
<b>Tableau 2.</b>	Plan d'expérience de type composite centré.	<b>27</b>
<b>Tableau 3.</b>	Tableau d'analyse de régression.	<b>29</b>
<b>Tableau 4.</b>	Grille des scores pour l'appréciation de la fermeté, la consistance et l'aspect du coagulum.	<b>37</b>
<b>Tableau 5.</b>	Représentation des différentes modalités des facteurs du plan de criblage.	<b>38</b>
<b>Tableau 6.</b>	Le plan de criblage à 8 essais conçu pour 5 facteurs et 2 niveaux (min, max).	<b>38</b>
<b>Tableau 7.</b>	Représentation des différentes modalités des facteurs du plan composite centré.	<b>39</b>
<b>Tableau 8.</b>	Matrice d'expériences de notre étude expérimentale en valeurs codées.	<b>40</b>
<b>Tableau 9.</b>	Plan expérimental de criblage et résultats d'essais.	<b>48</b>
<b>Tableau 10.</b>	Estimation des coefficients du modèle relatif aux deux réponses (acide lactique produit et l'aspect du yaourt).	<b>49</b>
<b>Tableau 11.</b>	Plan expérimental composite centré et résultats d'essais.	<b>52</b>
<b>Tableau 12.</b>	Estimation des coefficients du modèle relatif à l'acide lactique produit.	<b>53</b>
<b>Tableau 13.</b>	Estimation des coefficients du modèle relatif à l'aspect du yaourt.	<b>54</b>
<b>Tableau 14.</b>	Tableau d'analyse de régression relatif au modèle de la production d'acide lactique.	<b>60</b>
<b>Tableau 15.</b>	Tableau d'analyse de régression relatif au modèle de l'aspect du yaourt.	<b>60</b>

**Liste des figures.**

<b>Figure 1.</b>	Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés.	<b>6</b>
<b>Figure 2.</b>	Schéma illustrant les interactions de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> en culture mixte dans le lait.	<b>11</b>
<b>Figure 3.</b>	Table de passage du plan d'expérience à la matrice d'expériences.	<b>20</b>
<b>Figure 4.</b>	Exemple de diagramme des coefficients pour un plan à 3 facteurs à 2 modalités.	<b>23</b>
<b>Figure 5.</b>	Représentation graphique d'une surface de réponse.	<b>24</b>
<b>Figure 6.</b>	Exemple de représentation graphique de surface de réponse.	<b>31</b>
<b>Figure 7.</b>	Exemple de représentation graphique de courbes iso-réponse.	<b>31</b>
<b>Figure 8.</b>	Représentation des différentes températures testées pour la croissance des souches bactériennes.	<b>44</b>
<b>Figure 9.</b>	Cinétique de croissance des deux souches de lactobacille sur milieu MRS.	<b>45</b>
<b>Figure 10.</b>	Cinétique de croissance des trois souches de coque sur milieu M17.	<b>46</b>
<b>Figure 11.</b>	Cinétique de croissance des quatre souches en culture mixte sur lait.	<b>46</b>
<b>Figure 12.</b>	Graphe d'estimation des effets relatifs à la concentration d'acide lactique produit selon le plan de criblage.	<b>50</b>
<b>Figure 13.</b>	Graphe d'estimation des effets relatifs à l'aspect du yaourt produit selon le plan de criblage.	<b>50</b>
<b>Figure 14.</b>	Représentation graphique des effets relatifs à la concentration d'acide lactique produit selon le plan composite centré.	<b>56</b>
<b>Figure 15.</b>	Représentation graphique des effets relatifs à l'aspect du yaourt produit selon le plan composite centré.	<b>57</b>
<b>Figure 16.</b>	Représentations tridimensionnelles des effets des facteurs sur l'acide lactique produit et l'aspect du yaourt.	<b>58</b>
<b>Figure 17.</b>	Courbe de régression linéaire relative au model de la production d'acide lactique.	<b>61</b>
<b>Figure 18.</b>	Courbe de régression linéaire relative au model de l'aspect du yaourt.	<b>61</b>
<b>Figure 19.</b>	Superposition des courbes d'iso-réponse relatif à la production d'acide lactique et l'aspect du yaourt en fonction des deux facteurs température d'incubation et la quantité de lait en poudre ajouté.	<b>63</b>
<b>Figure 20.</b>	Superposition des courbes d'iso-réponse relatif à la production d'acide lactique et l'aspect du yaourt en fonction des deux facteurs température d'incubation et la quantité de sirop glucosé ajouté.	<b>63</b>

**Liste des photos.**

<b>Photo 1.</b>	Tubes de culture sur lait des souches bactériennes et du témoin.	<b>44</b>
-----------------	--	-----------

Les laits fermentés sont des produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait. Historiquement il s'agissait de permettre une meilleure conservation du lait qui est une matière première rapidement périssable. Depuis, ces produits ont rapidement gagné de l'intérêt du fait de leurs caractéristiques organoleptiques agréables (fraîcheur, acidité et onctuosité). Ils constituent ainsi une alternative intéressante à la consommation du lait et des fromages.

Le yaourt par lui-même en plus de son importance nutritionnelle a été identifié pendant longtemps en tant que nourriture saine due à l'action bénéfique de ses deux bactéries vivantes (*Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*). Ces dernières concurrencent les bactéries pathogènes aussi bien dans l'aliment que dans l'environnement (Tamime et Robinson, 1985).

En Algérie d'après une étude faite par Danone Djurdjura en 2007, la consommation moyenne de l'Algérien en yaourt oscille entre 5 et 6 kg/an, cette consommation augmente chaque année et cette hausse se justifie par la forte démographie, l'urbanisation et l'amélioration du pouvoir d'achat de la population. Mais qu'en est-il de la fabrication et de la qualité des produits fabriqués ?

Bien que la fabrication et la consommation des laits fermentés remonte à la plus haute antiquité, les progrès réalisés dans l'élaboration, la standardisation et la diversification des yaourts correspondent pour la plupart aux efforts de recherche entrepris au cours du siècle dernier. D'autant plus que toute variation de la composition de l'aliment et des procédés de fabrications entraîne une modification de sa structure et de ses propriétés rhéologiques, qui déterminent largement l'acceptabilité des produits. C'est un des rôles essentiels des scientifiques que de fournir une information précise, aussi bien en amont aux fabricants qu'en aval aux consommateurs.

Les répercussions de ces paramètres sur la qualité hygiénique, physico-chimique, nutritionnelle et organoleptique du yaourt ont fait l'objet de nombreux travaux de part le monde qui ont montré la relation très étroite qui existe entre la nature de la matière première ainsi que les procédés technologiques utilisés pour l'obtention d'un produit élaboré répondant aux normes requises et aux exigences de plus en plus aiguisées du consommateur. L'un des moyens de relier les paramètres influençant la fabrication du yaourt et les normes exigées de qualités du produit fini est l'expression mathématique du procédé. Il s'agit d'associer des mesures classiques et des modèles mathématiques afin d'estimer et/ou de prédire les grandeurs clés caractéristiques du produit et des procédés.

Ce travail s'inscrit dans cette démarche qui a pour principal objectif de développer des modèles mathématiques capables d'optimiser et de prédire en fonction des conditions de fabrication, la concentration d'acide lactique produit par nos souches et l'aspect du yaourt fini.

L'aspect du yaourt et l'acidification des bactéries lactiques sont fortement influencés par :

- des facteurs physiques à savoir la température d'incubation et l'activité de l'eau qui est liée à la présence de sucre.
- des facteurs chimiques liés à la composition du lait et à la quantité de poudre de lait ajoutée.
- des facteurs microbiologiques représentés par la taille de l'inoculum et le rapport entre les deux bactéries.

Afin de constituer une base de données servant à la validation des modèles mathématiques, des fabrications de yaourt modèles ont été réalisées à l'échelle du laboratoire. Ces yaourts ont étéensemencés par les deux bactéries typiques du yaourt que nous avons isolées à partir de yaourt commercialisés. La fabrication a été conduite selon deux plans d'expérience :

- le premier dit de criblage à 5 facteurs (température, taille de l'inoculum, ratio coque/bacille, lait en poudre et sirop glucosé rajouté) et à 2 niveaux (minimum, maximum), qui nous a permis de sélectionner les facteurs ayant une influence statistiquement significative,
- le deuxième dit central composite centré à 3 facteurs ayant un effet statistiquement significatif sur les deux réponses déjà citées issues du premier plan d'expérience et à 5 niveaux ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ) qui nous a permis par la suite l'optimisation du procédé.

Pour réaliser ce travail de modélisation, il a été choisi d'adopter une approche empirique ou boîte noire. Ceci nous a permis d'établir deux modèles donnant une corrélation statistique, quadratique entre les différentes grandeurs mesurées sans prendre en considération les phénomènes impliqués. Le premier modèle estime l'évolution des concentrations en acide lactique pendant la fabrication du yaourt. Le deuxième modèle décrit l'aspect du yaourt selon un score instauré.

Hormis l'introduction et la conclusion, le manuscrit est donc organisé en trois grands chapitres.

- Le premier chapitre consiste en une synthèse bibliographique sur le yaourt et la modélisation. En premier lieu la fabrication et la caractérisation du produit cible de cette étude, le yaourt, sont présentées. Après un rappel des caractéristiques générales des deux bactéries lactiques de ce produit et leur intérêt technologique, leur comportement associatif et les facteurs influençant leur métabolisme sont décrits. En deuxième lieu la modélisation par la méthode des plans d'expérience est présentée. Après une définition de cette méthodologie suivent les différentes étapes de cette démarche, pour finir par une validation du modèle et des informations obtenues.
- Dans le deuxième chapitre est exposé le large éventail des matériels et méthodes mises en œuvre dans le cadre du travail expérimental.
- Les résultats sont ensuite développés dans un troisième chapitre où ils sont discutés par la suite, pour finir avec la conclusion générale et les perspectives.

## 1. Synthèse bibliographique

### 1.1. Le yaourt

#### 1.1.1. Définition du yaourt

Selon le *Codex alimentarius* et la FAO (*Food and Agriculture Organization*, 1975), le yaourt est un « produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* à partir du lait (pasteurisé, concentré, partiellement écrémé enrichi en extrait sec) ». Les bactéries dans le produit fini doivent être vivantes et présentes en abondance. Ces produits doivent notamment être maintenus jusqu'à leur consommation à une température comprise entre 0 et 6 °C pour que les bactéries lactiques restent vivantes.

En fonction de la technologie de fabrication, les yaourts sont divisés en deux groupes :

- **Yaourts fermes**, dont la fermentation a lieu en pots. Ce sont généralement des Yaourts nature ou aromatisés.
- **Yaourts brassés**, dont la fermentation a lieu en cuves avant le conditionnement. Ce sont généralement des yaourts brassés nature ou aux fruits (Luquet et Carrieu, 2005).

Les critères pris en compte par le *Codex alimentarius* et la FIL (Fédération Internationale Laitière) dans la réglementation du yaourt sont les suivants :

- **Types de produit** : ils sont définis souvent en fonction de leur teneur en matière grasse ou de l'adjonction éventuelle d'ingrédients (yoghourt partiellement écrémé ou maigre, yoghurt écrémé, le yoghurt sucré et le yoghurt nature).
- **Le type de ferment utilisé** : selon la FIL (Fédération Internationale Laitière), et de nombreux pays, la dénomination « yaourt » nécessite l'utilisation obligatoire et exclusive des deux ferments caractéristiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Luquet et Carrieu, 2005).
- **La quantité de ferment contenue dans le produit fini** : la FIL fixe la quantité de ferments vivants, égale à  $10^7$  bactéries par gramme rapportés à la partie lactée jusqu'à la date limite de consommation.
- **La viabilité de la flore lactique** : flore viable pendant toute la durée de vie.
- **Ingrédients laitiers** : lait pasteurisé, congelé, écrémé, concentré, en poudre, crème et caséines etc.
- **Ingrédients non laitiers** : une multitude d'ingrédients peut être incorporée dans le yaourt. Il peut s'agir par exemple de fruits sous différentes formes (purée, jus, pulpe, sirop etc.), de céréales, de légumes ou de sucre. La quantité d'ingrédients non laitiers est fixée par le *Codex alimentarius*, la FIL et la plupart des pays à moins de 30% en poids du produit fini.
- **pH** : La FIL préconise une teneur de 0,7% d'acide lactique. Cette valeur est respectée dans certains pays avec une variabilité de 0,6 à 15%. Certaines normes imposent un pH inférieur à 4,5 ou 4,6.

- **Taux de matière grasse** : Il doit être au minimum, inférieur à 3% (m/m) dans le cas des yaourts (nature, sucré ou aromatisé), compris entre 0,5 et 3% dans le cas des yaourts partiellement écrémés et 0,5% dans les yaourts écrémés.
- **Teneur en protéines** : elle est égale à 2,8% dans le produit fini.

### 1.1.2. Historique

Le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) originaire d'Asie, vient de «yoghurmark», mot turc signifiant «épaissir» (Tamime et Deeth, 1980).

En 1902, deux médecins français, Ris et Khoury, isolent les bactéries présentes dans un lait fermenté égyptien. Metchnikoff (1845-1916) isole ensuite la bactérie spécifique du yaourt «le bacille bulgare», analyse l'action acidifiante du lait caillé et suggère une méthode de production sûre et régulière (Rousseau, 2005). En effet, c'est en 1919 qu'Isaac Carasso commence à produire du yaourt à Barcelone selon des procédés industriels (Pelletier *et al.*, 2007).

Le yaourt dit «nature» constituait l'essentiel des productions de laits fermentés, mais à partir des années 1960-1970 sont apparus les produits sucrés puis aromatisés et aux fruits.

### 1.1.3. Matières premières et ingrédients

La principale matière première pour la fabrication des yaourts est le lait dont, pour l'essentiel, le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et de 12% de matière sèche contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (Tamime et Robinson, 1985).

Dans notre étude nous avons utilisé du lait écrémé «Candia Silhouette», donc nous allons nous limiter à sa composition (tableau 1.)

**Tableau 1.** Principaux composants du lait écrémé (Mietton *et al.*, 1994)

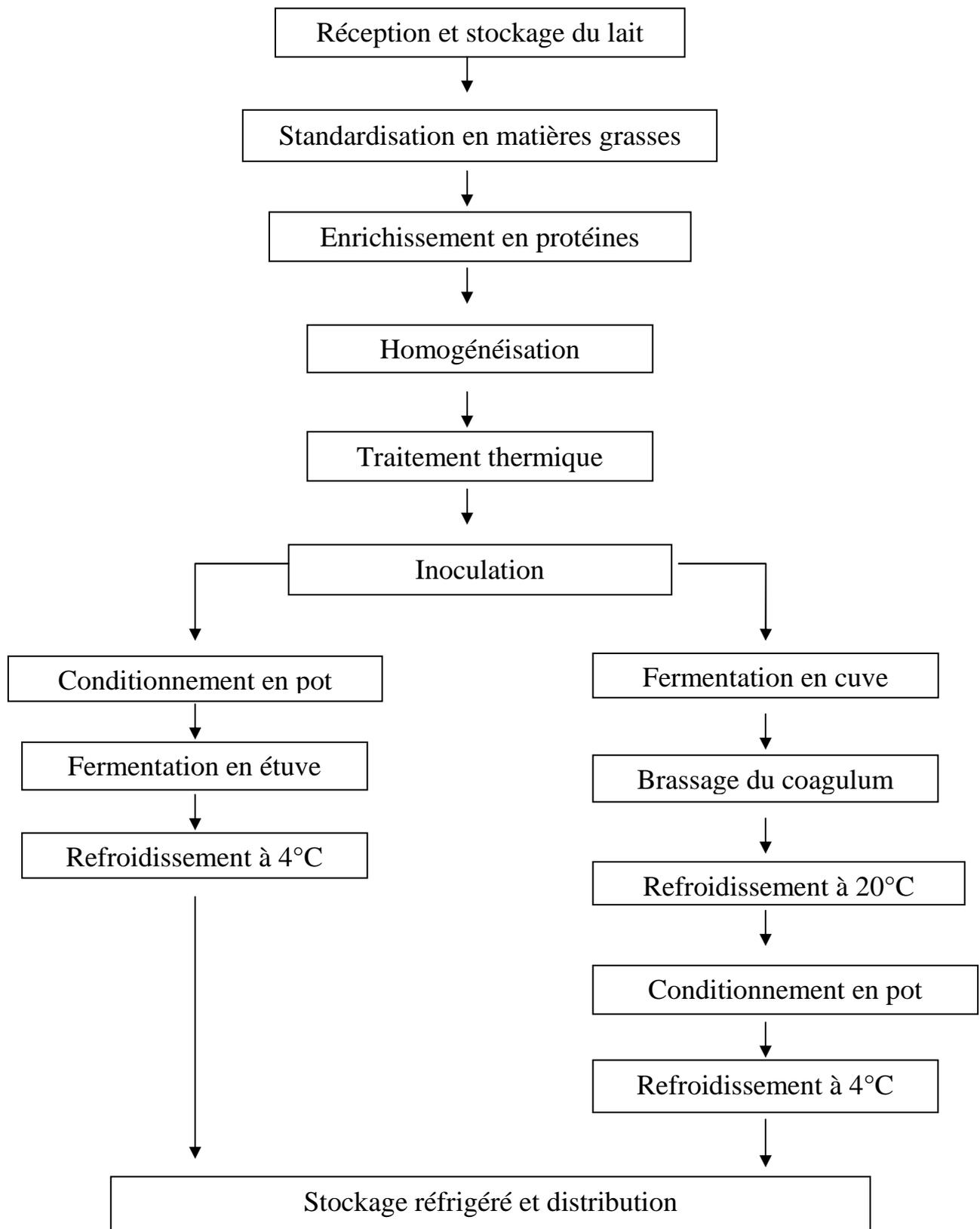
	Composition moyenne du lait écrémé (g/kg)
Eau	912 - 903
Carbohydrates (essentiellement lactose)	50 - 52
caséines	22 - 28
Protéines sériques (ou lactosérum) (essentiellement $\beta$ -lactoglobuline)	7 - 8
Sel + autres constituants	8 - 9

Afin d'accroître la viscosité apparente et la consistance des yaourts, la teneur en matière sèche du lait écrémé utilisé est augmentée au préalable jusqu'à 10-12% (Schkoda *et al.*, 2001 ; Van Marle, 1998). Après concentration (par évaporation ou osmose inverse) ou, plus fréquemment, addition de poudre de lait écrémé ou de protéines de lactosérum (Mahaut *et al.*, 2000), on parlera alors de lait écrémé fortifié ou enrichi.

Des agents de texture (épaississants ou gélifiants) peuvent être ajoutés dans le cas des yaourts brassés sans matière grasse, afin d'améliorer l'apparence, la viscosité et la consistance de ces derniers.

Le lait peut être additionné de sucre avant la fermentation, à hauteur de 5 à 10 %. Cette addition conditionne le choix des ferments, car certaines souches sont sensibles à la diminution de l'activité de l'eau qui résulte de cette opération. Parfois, le sucre est apporté en deux fois, une partie avant la fermentation, une partie après, pour ne pas ralentir l'acidification. Le sucre est généralement constitué de saccharose, cristallisé ou sous forme liquide (sirop).

Il est aussi courant d'utiliser du sucre inverti (sirop de saccharose hydrolysé), qui contient, à parts égales, du glucose et du fructose. Son intérêt est qu'il reste liquide à des teneurs élevées en matières sèches (65 à 67 %). Il existe aussi des sirops de sucre inverti dont une partie du glucose a été isomérisé en fructose (sirops à haute teneur en fructose). Ils ont l'avantage de présenter un pouvoir sucrant plus élevé que les précédents. Enfin, dans le cas des produits allégés, le sucrage est effectué par addition d'édulcorants (aspartam ou polyols). Comme ces produits sont sensibles au chauffage, ils sont toujours ajoutés après le traitement thermique.



**Figure 1.** Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés.

#### **1.1.4. Caractéristiques générales des bactéries du yaourt**

##### **1.1.4.1 *Streptococcus thermophilus*.**

*St. thermophilus* est un coque à Gram positif, anaérobie facultatif, non mobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages (Dellagio *et al.*, 1994 ; Roussel *et al.*, 1994). C'est une bactérie dépourvue d'antigène du groupe D, thermorésistante, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques. Elle est aussi résistante au chauffage à 60°C pendant 30 minutes (Dellagio *et al.*, 1994). Elle est isolée exclusivement du lait et des produits laitiers sous forme de coques disposés en chaînes de longueurs variables ou par paires. Sa température optimale de croissance varie entre 40 et 50°C et son métabolisme est du type homofermentaire (Lamoureux, 2000).

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés. Elle augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (composés de galactose, glucose, ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et de mannose) (Bergamaier, 2002).

##### **1.1.4.2. *Lactobacillus bulgaricus*.**

*Lb. bulgaricus* est un bacille Gram positif, immobile, asporulé, microaérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chainettes. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive d'acide lactique comme principal produit final à partir des hexoses de sucres par voie d'Embden Meyerhof. Il est incapable de fermenter les pentoses.

*Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Cette bactérie a un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (Marty-Teysset *et al.*, 2000).

Ces deux bactéries lactiques tolèrent de petites quantités d'oxygène. Ceci peut être probablement relié au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui est produit dans les cellules en présence d'air. Le système le plus efficace pour éliminer le peroxyde d'hydrogène est l'utilisation d'une enzyme, la catalase, dont les bactéries lactiques sont déficientes. Ces dernières possèdent plutôt une peroxydase (pseudo catalase) qui est moins efficace que la catalase. Comme les bactéries lactiques n'éliminent pas facilement le peroxyde, elles sont dites microaérophiles (Doleyres, 2003).

#### **1.1.5. Intérêt et fonctions des bactéries du yaourt**

##### **1.1.5.1 Production d'acide lactique.**

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien (Schmidt *et al.*, 1994). Le métabolisme est de type homofermentaire (production exclusif de l'acide lactique). L'acidité du yaourt est communément exprimée en degré Dornic (1°D = 0.1g/l d'acide lactique), et elle se situe entre 100 et 130°D (Loones, 1994).

L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit :

- Il aide à déstabiliser les micelles des caséines, ce qui conduit à la formation du gel.
- Il donne au yaourt son goût distinct et caractéristique, comme il contribue à la saveur et à l'aromatisation du yaourt (Tamime et Robinson, 1999 ; Singh *et al.*, 2006).
- Il intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (Leory *et al.*, 2002).

#### 1.1.5.2. Activité protéolytique

Pour satisfaire leurs besoins en acides aminés, les bactéries du yaourt doivent dégrader la fraction protéique du lait constituée de caséine et de protéines sériques, leur système protéolytique est constitué de deux types d'enzymes distinctes : les protéases et les peptidases. *Lb. bulgaricus* possède des protéases localisées, pour l'essentiel, au niveau de la paroi cellulaire (Marshall, 1987). Cette activité protéasique permet d'hydrolyser la caséine en polypeptide.

*St. thermophilus* est considéré comme ayant une faible activité endopeptidasique. Elle dégrade les polypeptides par son activité exopeptidasique en acides aminés libres.

#### 1.1.5.3. Activité aromatique

Divers composés volatiles et aromatiques interviennent dans la saveur et l'appétence du yaourt. C'est principalement le lactose qui intervient dans la formation de ces composés. Parmi ceux-ci, l'acide lactique confère au yaourt son goût acidulé. L'acétaldéhyde, qui provient en grande partie de la thréonine, joue un rôle essentiel dans ces caractéristiques organoleptiques recherchées. La concentration optimale de ce métabolite est estimée à environ 10 ppm. Sa production, due principalement au lactobacille, est augmentée lorsque ce dernier est en association avec le streptocoque qui en élabore de faibles quantités.

L'acétaldéhyde peut provenir :

- Du pyruvate, soit par action de la pyruvate décarboxylase ou par action de la pyruvate déshydrogénase (appelée aussi pyruvate formate lyase).
- De la thréonine par l'action de la thréonine aldolase.

Le diacétyl contribue à donner un goût délicat qui est dû à la transformation de l'acide citrique et, secondairement, du lactose par certaines souches de streptocoques. D'autres composés (acétone, acétoïne, etc.) contribuent à l'équilibre et à la finesse de la saveur. Ceci résulte d'un choix avisé des souches, de leur capacité à produire dans un juste rapport les composés aromatiques et du maintien de ce rapport au cours de la conservation des levains et de la fabrication (Anonyme, 1995).

Notons que la saveur caractéristique du yaourt, due à la production du diacétyl et de l'acétaldéhyde et qui est recherchée dans les produits type «nature», est en partie masquée dans les yaourts aromatisés.

#### 1.1.5.4. Activité texturante

La texture et l'onctuosité constituent pour le consommateur d'importants éléments d'appréciation de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent à partir du glucose des polysaccharides qui en formant des filaments limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt.

L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (EPS) qui, selon une étude portant sur plusieurs souches serait essentiellement composée de rhamnose, de arabinose, et de mannose (Schmidt *et al.*, 1994).

Il est couramment admis que la production des EPS est le résultat de l'action exercée par *St. thermophilus*. Mais d'après Tamime (1999), *Lb. bulgaricus* possède une aptitude à produire des EPS composés de galactose, glucose, rhamnose à des rapports de 4/1/1.

#### 1.1.6. Comportement associatif des deux souches

*St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* se développent en association, appelée protocoopération, dans des cultures mixte (figure 2) ayant un intérêt à la fois d'ordre technologique et nutritionnel (Driessen, 1981 ; Radke-Michell et Sandine, 1984 ; Radke-Michell et Sandine, 1986).

Ces bactéries, par leur activité acidifiante, ont un effet bénéfique du point de vue qualité hygiénique de produit. En parallèle, elles engendrent des produits secondaires qui contribuent à la qualité organoleptiques du yaourt. D'un point de vue nutritionnel l'activité fermentaire de ces espèces lactiques favorise une solubilisation des différents constituants du lait améliorant ainsi leur biodisponibilité (Courtin *et al.*, 2002 ; Ngounou *et al.*, 2003).

Lors de la production de yaourt l'utilisation combinée des deux espèces bactériennes permet de valoriser l'interaction indirecte positive existante entre elles. Cette interaction appelée protocoopération se traduit d'abord par une augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures, la coagulation du lait prend 6-10h à 45°C en culture pure et 2-2,5h en culture mixte (Davis, 1971 ; Pette et Lolkema, 1951). Un accroissement des concentrations bactériennes est observé en parallèle (Amoroso et Nanca, 1990) avec une résistance plus élevée à l'acidité du milieu (Radke-Michell et Sandine, 1986 ; Accolas *et al.*, 1982 ; Flejtas et Gruev, 1977 ; Juillard *et al.*, 1988). Elle induit également une amélioration de la production des composés d'arômes (acétaldéhyde notamment) (Chomakov, 1987 ; Matalon, 1986 ; Abou-Donia, 1986 ; Flejtas et Gruev, 1977 ; Obretenova, 1987) et de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes de synérèse) (Kondratenko *et al.*, 1985 ; Matalon et Sandine, 1986 ; Abou-Donia, 1986 ; Ernest, 1990).

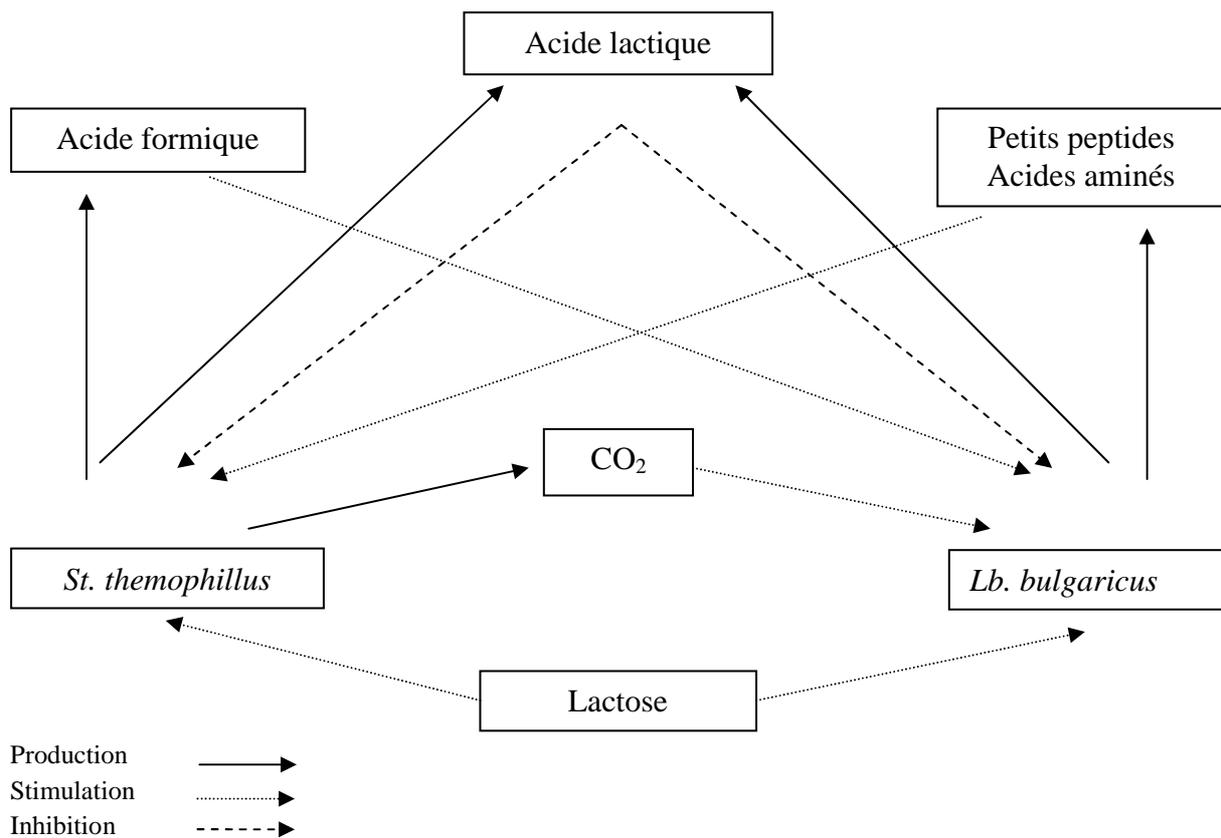
#### 1.1.7. Facteur influençant la proto-coopération des deux souches

Le métabolisme mutuel de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* dans le lait est montré dans la figure 2 et commenté dans plusieurs documents (Driessen, 1981 ; Driessen et Kingma, 1982). nous citerons quelques unes des interactions fondamentales entre les deux espèces dans la culture de départ.

La stimulation de *St. thermophilus* par *Lb. bulgaricus* est réalisée grâce à l'activité protéolytique du lactobacille, qui libère des petits peptides et des acides aminés au profit du streptocoque (Driessen et Kingma, 1982 ; Tammam *et al.*, 2000). Les plus importants de ces acides aminés nécessaires à la croissance mutuelle des deux souches sont : l'histidine, la thréonine, la valine (Tamime et Robinson, 2003).

En retour, *St. thermophilus* fournit de l'acide formique et du CO<sub>2</sub> qui tous deux vont stimuler la croissance de *Lb. bulgaricus* (Tamime et Robinson, 2003 ; Bottazzi *et al.*, 1972 ; Kosikowski, 1982). *St. thermophilus* assimile l'oxygène dans le lait plus rapidement, créant ainsi des conditions favorables pour la croissance de *Lb. bulgaricus* (Tamime et Robinson, 2003 ; Kosikowski, 1982 ; Yaygin, 1970). Selon certains auteurs *St. thermophilus* produit de grandes quantités de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) qui n'est pas issu du métabolisme du lactose (Driessen et Kingma, 1982 ; Thunell et Sandine, 1985), ce CO<sub>2</sub> produit est dû à l'activité de l'uréase qui hydrolyse l'urée du lait en CO<sub>2</sub> et NH<sub>3</sub> (Eck et Gillis, 1997 ; Juillard *et al.*, 1998). Certaines souches de *St. thermophilus* ne possèdent pas cette activité protéasique (Simova, 2007 ; Angelov *et al.*, 2009), par conséquent certains auteurs expliquent cette production de CO<sub>2</sub> par la voie de Leloir selon laquelle le galactose produit est transformé en acide lactique et en CO<sub>2</sub>, assurant ainsi les conditions d'anaérobiose pour la croissance des lactobacilles.

Lorsque d'autres bactéries notamment probiotiques sont associées aux bactéries du yaourt, d'autres interactions prennent place. Par exemple, les bifidobactéries sont stimulées par l'activité protéolytique des lactobacilles alors que *Lb. bulgaricus* limite le développement de *Lb. acidophilus* (phénomènes de compétition et d'inhibition). En outre, des phénomènes de croissance associative ont été démontrés entre *St. thermophilus* et *Lb. helveticus* ou *Lb. acidophilus*. Enfin, des mécanismes d'inhibition spécifique entre les souches liés à la production de bactériocines existent chez les bactéries probiotiques comme chez les bactéries du yaourt. Ces caractères sont toutefois dépendants des souches présentes dans le milieu. Il est donc nécessaire de vérifier la compatibilité des souches avant de les associer (Beal et Sodini, 2003).



**Figure 2.** Schéma illustrant les interactions de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut *et al.*, 2000)

### 1.1.8. Principaux facteurs influençant le métabolisme des bactéries lactiques

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

#### 1.1.8.1. Facteurs physiques

La **température** est le premier facteur environnemental à considérer pour le développement des bactéries lactiques. Elle agit sur les vitesses des réactions chimiques et biochimiques. Elle doit être aux alentours de 30°C pour les bactéries mésophiles et de 42°C pour les espèces thermophiles.

L'**activité de l'eau** ( $a_w$ ) est liée à la présence de sels ou de sucres. Lorsqu'elle diminue la quantité d'eau libre décroît et la disponibilité des nutriments est affectée. Concernant les laits fermentés seule la présence de saccharose (cas des yaourts sucrés) peut diminuer cette activité. C'est le cas lorsque cette dernière devient inférieure à 0,99 correspondant à une concentration en saccharose de 10 %, l'activité métabolique des bactéries est affectée (Tamime et Robinson, 1985).

### 1.1.8.2. Facteurs chimiques

La **qualité du lait** est un facteur d'influence prépondérante pour le développement des bactéries lactiques. Si les teneurs initiales en lactose et en sels minéraux sont suffisantes dans le lait, ce n'est pas le cas de la fraction azotée libre (acides aminés et oligopeptides). La limitation en certaines molécules peut constituer un frein à la croissance.

Le **traitement thermique** subi par le lait avant l'étape de fermentation va agir favorablement sur le métabolisme des bactéries. En effet, outre son rôle principal de destruction des micro-organismes indésirables et pathogènes (Boudier, 1990), il permet de détruire les principales substances antibactériennes naturellement présentes dans le lait (agglutinines, lactoperoxydases) ce qui favorisera les croissances bactériennes (Farkye et Imafidon, 1995). De plus, il génère de faibles quantités d'acide formique à partir du lactose, ce qui stimulera la croissance des lactobacilles (Loones, 1994). Enfin, il contribue à l'augmentation de la teneur du lait en petits peptides et en acides aminés libres.

Le **pH** est le troisième facteur chimique important pour la croissance des bactéries lactiques. Il intervient sur la disponibilité en nutriments du milieu, sur la perméabilité de la membrane cellulaire et sur les vitesses d'activité enzymatique. Lors de la production de yaourt il n'est pas contrôlé et représente donc un facteur majeur de ralentissement du métabolisme bactérien (Beal et Sodini, 2003).

### 1.1.8.3. Facteurs microbiologiques

Le **taux d'ensemencement** du lait avec les bactéries lactiques influence fortement sa transformation. Plus il est élevé, plus rapide est la fermentation. Généralement, ce taux se situe autour de  $10^6$  UFC/ml (UFC : unités formant colonie) pour simultanément obtenir des durées de fabrication courtes et limiter le coût d'achat des ferments. Pour un ensemencement direct cela correspond à un taux d'inoculation compris entre 2,5 g et 70 g pour 100 L de lait selon l'espèce bactérienne considérée (Beal et Corrieu, 1991).

Les **équilibres de population** agissent également sur les cinétiques microbiennes. Ainsi dans le cas de la fabrication du yaourt la durée de la fermentation varie selon la valeur initiale du rapport entre streptocoques et lactobacilles, même si en fin de culture les streptocoques sont toujours majoritaires. Pour le yaourt la proportion entre streptocoques et lactobacilles habituellement préconisée est de 1:1 mais elle dépend fortement des souches en présence (Beal et Corrieu, 1991).

### 1.1.9. Les grandes étapes de la fabrication des yaourts

Les procédés de fabrication des yaourts et des laits fermentés se caractérisent par trois grandes étapes : la préparation du lait, la fermentation et les traitements post-fermentaires du produit. Le diagramme de production diffère selon le type de produit (yaourt ferme ou brassé) et présente des variantes selon sa teneur en matières grasses et son arôme. Le diagramme général de production (figure 1) présente les étapes de la fabrication qui sont détaillées aux paragraphes suivants :

### 1.1.9.1. Standardisation et homogénéisation du mélange

La matière première utilisée (lait frais, lait combiné, mélange des deux) le lait doit être standardisé en matières grasses, enrichi en protéines, et éventuellement sucré, pour répondre aux spécifications nutritionnelles et organoleptiques des produits.

Pour bien assimiler l'importance de la standardisation ou de l'enrichissement du lait sur la qualité finale du yaourt, il est nécessaire de donner le rôle de chaque composante du lait.

- Le gras a un effet sur l'onctuosité et la sensation de douceur en bouche
- Le lactose est la matière première utilisée pour l'acidification et à un faible pouvoir sucrant, soit quatre fois plus faible que celui du sucre.
- Les protéines de par leur coagulation et leur capacité de liaison avec l'eau agissent sur la texture particulièrement sur la viscosité, la consistance, l'élasticité et la fermeté
- Les minéraux participent à la stabilisation du gel (Vignola, 2002).

L'homogénéisation réduit le diamètre des globules gras et permet ainsi une meilleure dispersion de ceux-ci dans le produit, limite leurs remontées au cours de l'incubation et donne une consistance plus uniforme au yaourt fabriqué.

La consistance et la viscosité du yaourt sont pour une grande partie sous la dépendance de la matière sèche du lait. La matière grasse confère de l'onctuosité, masque l'acidité et améliore la saveur. Les protéines améliorent la texture et masquent aussi l'acidité. Selon le code des recommandations FAO/OMS (1974), la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse doit être de 8,2% en poids quelle que soit la teneur en matière grasse.

### 1.1.9.2. Le traitement thermique

Le lait enrichi éventuellement sucré subit un traitement thermique. Le barème de traitement thermique le plus couramment utilisé est de 90-95°C pendant 3 à 5 minutes (Mahaut *et al.*, 2000 ; Boudier, 1990). À l'issue du traitement thermique, le lait est refroidi à la température de fermentation. Ce traitement a de multiples effets sur la flore microbienne ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du lait. Tout d'abord, il crée des conditions favorables au développement des bactéries lactiques. Il détruit les germes pathogènes et indésirables (Boudier, 1990) et inactive des inhibiteurs de croissance tels que les lactoperoxydases (Farkye et Imafidon, 1995).

De même, il réduit les sulfures toxiques et entraîne la production d'acide formique qui est un facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus* (Loones, 1994). Le traitement thermique a également un effet sur la conformation tridimensionnelle des protéines du lactosérum (85%) qui se fixent ainsi sur les molécules de caséines. Enfin, il modifie les équilibres salins en entraînant une augmentation de la taille des micelles des caséines, de leur stabilité et de la qualité d'eau liée (Mahaut *et al.*, 2000).

Au niveau rhéologique ces modifications se traduisent par une amélioration après fermentation de la fermeté des gels (Kalab *et al.*, 1976 ; Mottar *et al.*, 1989). De plus, le traitement thermique entraîne une production plus importante d'acétaldéhyde le composé responsable de l'arôme « yaourt » (Singh, 1983).

### 1.1.9.3. Fermentation lactique

Le lait enrichi et traité thermiquement est refroidi à la température de fermentation 40-45°C. Cette température correspond à l'optimum de développement symbiotique des bactéries lactiques (Loones, 1994). Leur inoculation se fait à un taux assez élevé variant de 1% à 7%, pour un ensemencement indirect à partir d'un levain avec un ratio *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* de 1,2 à 2 pour les yaourts nature et pouvant atteindre 10 pour les yaourts aux fruits (Boudier, 1990 ; Mahaut *et al.*, 2000). L'ensemencement direct à partir des bactéries lactiques concentrées congelées se fait à des taux de l'ordre de 0,03 %.

Les deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* vivent en symbiose et en synergie. Lors de leur croissance elles dégradent le lactose en acide lactique entraînant une baisse du pH et la gélification du milieu avec des modifications structurales irréversibles. En outre, ces bactéries produisent des composés carbonylés volatils (l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle) (Imhof *et al.*, 1994; Ott *et al.*, 1997) et des exopolysaccharides (Cerning *et al.*, 1990) qui participent respectivement à l'élaboration de l'arôme et à la texture des yaourts.

Lorsque le pH atteint une valeur comprise entre 4,3 et 4,7 un refroidissement en deux temps (rapide jusqu'à 25°C, puis plus lent jusqu'à 5°C) est appliqué afin de stopper la fermentation. En effet l'activité des bactéries lactiques est limitée pour des températures inférieures à 10°C (Tamime et Robinson, 1985).

### 1.1.9.4. Conditionnement et stockage

Les yaourts conditionnés dans des pots en verre ou en plastique sont stockés en chambres froides à 4°C en passant au préalable dans des tunnels de refroidissement. A ce stade ils sont prêts à être consommés. La durée limite de leur consommation est de 28 jours (Luquet et Corrieu, 2005 ; Paci Kora, 2004). Pendant le stockage les bactéries lactiques maintiennent une activité réduite. Cette évolution appelée post-acidification se traduit par une légère baisse du pH surtout pendant les 2 premiers jours de stockage.

### 1.1.10. Structure et comportement rhéologique des yaourts

La transformation du lait au yaourt s'accompagne de la mise en place d'une structure complexe et d'un changement important des propriétés rhéologiques en passant d'un liquide Newtonien à un gel viscoélastique à destruction non réversible. Les additifs et les étapes du procédé de fabrication jouent un rôle majeur sur le comportement rhéologique du yaourt qui sera apprécié par le consommateur (Paci Kora, 2004).

## 1.2. Modélisation

### 1.2.1. Introduction à la modélisation

Un modèle peut être défini comme étant un système physique mathématique ou logique représentant les structures essentielles d'une réalité et capable d'en expliquer ou d'en reproduire dynamiquement le fonctionnement; c'est une représentation sous une forme quelconque d'un objet, d'un processus ou d'un système (Hubert, 1996) et selon la définition du National Research Council (1990), un modèle mathématique est une tentative systématique de traduire la compréhension conceptuelle d'un système réel en des termes mathématiques.

Cette expression mathématique est conçue dans un but bien défini (Walter et Pronzato, 1994 ; Hubert, 1996 ; Viennet, 1997 ; Wiechert, 2002) qui peut être: la connaissance structurelle, la simulation exploratoire, l'explication des phénomènes complexes, la détermination des grandeurs non mesurées à partir de mesures indirectes, la prédiction d'un comportement et l'exploitation des connaissances, la conduite et l'optimisation d'un procédé afin d'améliorer ses performances. Ainsi, il est possible de catégoriser les modèles en fonction de leur objectif en modèles prédictifs, modèles explicatifs, modèles de stockage de la connaissance et modèles associés à l'automatique (Bernard, 2004)

Selon la nature des connaissances introduites deux approches majeures de la modélisation peuvent être adoptées :

- L'approche empirique ou boîte noire qui permet d'établir des modèles donnant une corrélation statistique linéaire ou non entre différentes grandeurs mesurées, sans prendre en considération les phénomènes impliqués. C'est cette approche là que nous avons choisie pour mener notre étude.
- L'approche mécanistique basée sur les lois biologiques, physiques, chimiques régissant le comportement du processus considéré.

Commençons d'abord par définir quelques notions de base :

### 1.2.2. Définition d'un processus

Un processus est un ensemble d'activités corrélées ou interactives qui transforme des éléments d'entrée en éléments de sortie

Un processus est caractérisé par :

- une ou plusieurs grandeurs de sortie mesurables qui constituent le résultat du processus.
- une ou plusieurs grandeurs d'entrée (ou facteurs) qui peuvent être de deux types :
  - des entrées sur lesquelles il est possible d'agir (entrées de commande).
  - des entrées sur lesquelles il n'est pas possible d'agir (perturbations) ; ces dernières peuvent être aléatoires ou déterministes mesurables ou non mesurables.

Les processus peuvent être de toutes natures : physique, chimique, biologique, écologique, financier, sociologique, etc.

### 1.2.3. Définition des modèles.

Nous nous intéressons ici aux modèles mathématiques qui représentent les relations entre les entrées et les sorties du processus par des équations. Si ces équations sont algébriques le modèle est dit statique, par contre si elles sont des équations différentielles ou des équations aux différences récurrentes le modèle est dit dynamique respectivement à temps continu ou à temps discret.

Un modèle est caractérisé par son domaine de validité c'est-à-dire par le domaine de l'espace des entrées dans lequel l'accord entre les valeurs des sorties du processus calculées par le modèle et leurs valeurs mesurées est considéré comme satisfaisant, compte tenu de l'utilisation que l'on fait du modèle.

### 1.2.4. Buts d'une modélisation

Un modèle peut être utilisé soit :

- Pour simuler un processus à des fins pédagogiques, de détection d'anomalies de fonctionnement, de diagnostic de pannes, de conception assistée par ordinateur, etc.
- Pour effectuer la synthèse d'une loi de commande, ou pour être incorporé dans un dispositif de commande.

### 1.2.5. Les étapes de la conception d'un modèle.

Lors de la conception d'un modèle de connaissances la relation entre les entrées et la (ou les) sortie(s) du modèle découlent directement de la mise en équation des phénomènes physiques, chimiques, ou autres qui régissent le fonctionnement du processus.

Dans le cas d'une modélisation de type "boîte noire" la construction du modèle nécessite les trois éléments suivants :

- Une hypothèse sur l'existence d'une relation déterministe liant les entrées à la (ou aux) sortie(s). Cette relation est caractérisée par une fonction appelée *fonction de régression* (ou plus simplement *régression*).
- Une séquence de mesures des entrées et de la sortie du processus.
- Un algorithme d'apprentissage.

Afin de réaliser la séquence de mesures des entrées et de la sortie du processus nous avons choisis d'utiliser la méthode des plans d'expérience.

### 1.2.6. Modélisation par la méthode des plans d'expériences

A l'époque actuelle bon nombre de procédés de fabrication ou d'expériences en laboratoire deviennent de plus en plus complexes car ils dépendent d'un grand nombre de variables difficiles à régler intuitivement.

Seule la réalisation d'expériences va permettre d'appréhender et de modéliser de tels phénomènes complexes. Si ces expériences sont effectuées sans une méthodologie rigoureuse il est fort probable qu'elles vont soit conduire à des impasses (modèle impossible à ajuster, résultats incohérents, *etc...*), soit à des résultats de qualité décevante c'est là qu'interviennent les plans d'expériences permettant d'organiser au mieux les essais afin d'optimiser ce type de démarche (Goupy, 2001).

L'objectif principal de cette méthode peut être résumé par la devise :

**"Obtenir un maximum d'information en un minimum d'expériences"** (Box *et al.*, 2005)

En d'autres termes la méthode des plans d'expériences (MPE) cherche à déterminer une relation entre 2 types de grandeurs : la réponse qui correspond à la grandeur physique étudiée (la sortie pour le modèle) et les facteurs qui correspondent aux grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur et censés influencer sur les variations de la réponse (les entrées pour le modèle).

La méthode des plans d'expériences peut être utilisée dans deux types d'investigations :

- Les études de criblage ou screening,
- Les études de surface de réponse (MSR).

La technique du screening permet de déterminer parmi les facteurs recensés par l'expérimentateur ceux qui ont une influence statistiquement non négligeable sur les variations de la réponse. On procède ainsi implicitement à une simplification du problème. On recherche *pourquoi* la réponse varie (en fonction de quels facteurs). En plus des facteurs influents il est également possible d'identifier les interactions de facteurs qui auront une influence significative sur la réponse.

Dans une application de la méthodologie de surface de réponse (MSR) les variations de la réponse sont calculées en fonction des facteurs et interactions précédemment jugés influents. Cette étude est davantage quantitative le but étant de déterminer *comment* la réponse varie.

Une dépendance fondamentale existe entre l'objectif recherché (screening ou MSR) et la définition du plan d'expériences. Cependant, dans les deux cas les étapes de la démarche se déroulent dans un ordre similaire à savoir :

- Définition des objectifs et des réponses,
- Choix d'une stratégie expérimentale,
- Définition des facteurs,
- Définition du domaine expérimental,
- Définition du modèle empirique,
- Construction du plan d'expériences,
- Expérimentation,
- Analyse globale des résultats d'essais,
- Analyse mathématique des résultats d'essais,
- Analyse statistique du modèle,
- Analyse graphique du modèle,
- Validation du modèle et des informations obtenues,

Nous cherchons dans ce travail à définir les conditions optimales pour avoir un bon yaourt. Pour cela nous utiliserons la méthode des plans d'expérience dans un premier temps pour le criblage et ensuite pour l'étude des surfaces de réponses qui nous permettra d'obtenir des modèles de la forme suivante (Goupy, 1999) :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i x_i + \sum_{i=0}^K \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K \beta_{ij} x_i x_j$$

Dans lequel  $\beta$  représente les coefficients du modèle à identifier ( $\beta_0$  la constante,  $\beta_i$  les coefficients associés aux facteurs,  $\beta_{ii}$  les coefficients associés aux termes quadratiques et  $\beta_{ij}$  les coefficients associés aux interactions d'ordre (1),  $k$  désigne le nombre de facteurs  $x_i$  pris en considération dans le modèle.

### 1.2.7. Méthode de criblage ou Screening

La première famille de problèmes auxquels les plans d'expériences peuvent apporter une aide concerne les plans dits de criblage ou screening. Ces plans concernent la compréhension de l'effet des facteurs qui affectent le processus. Le but de cette phase d'identification est de limiter le nombre de facteurs en vue d'une étude de surface de réponse. Nous allons maintenant revenir sur le contenu des 12 étapes citées dans le premier paragraphe dans le cas d'une étude de criblage avant de les appliquer à notre cas.

### 1.2.7.1. Définition de l'objectif de l'étude

Il s'agit ici de la première étape de la démarche méthodologique qui consiste à bien décrire le problème et en particulier à clairement préciser ce qu'on attend de la campagne expérimentale. Voici quelques voies d'investigation pour lesquelles les plans d'expériences de criblage peuvent s'appliquer :

- Hiérarchiser les conséquences des changements de modalités des facteurs sur une réponse variable et identifier ainsi les facteurs ayant une influence significative sur cette réponse, comme ce sera le cas dans notre étude.
- Estimer les effets moyens des facteurs avec une incertitude minimale.
- Préciser les effets moyens des facteurs par des interactions.
- Proposer une orientation de réglage pour un processus.
- Mettre en œuvre une ingénierie robuste.

Il est également nécessaire de définir la/les réponses observées lors de l'expérimentation.

### 1.2.7.2. Définition de la/les réponse(s) caractérisant l'objectif

L'estimation et la comparaison des effets des facteurs s'appuient sur l'analyse des résultats des essais qui représentent les valeurs particulières de grandeurs que la terminologie des plans d'expériences appelle des réponses. Les modifications des réglages de tout processus conduisent à l'observation des variations d'une ou plusieurs réponses.

Les réponses doivent être de nature quantitative afin de permettre l'utilisation de méthodes d'analyses statistiques telles que l'analyse de la variance ou de régression dont les hypothèses sont généralement admises lors de la mise en œuvre d'un plan d'expériences.

### 1.2.7.3. Choix d'une stratégie expérimentale

Choisir une stratégie expérimentale consiste à évoquer la/les méthodes à mettre en œuvre afin d'apporter des éléments de réponse aux questions que se posent les expérimentateurs.

Les plans d'expériences pour l'étude des effets des facteurs constituent la méthode qui semble s'imposer dès lors qu'il est impossible pour des raisons souvent matérielles de réaliser un plan complet c'est-à-dire l'ensemble des combinaisons des modalités des facteurs.

Quand le nombre de facteurs et de modalités augmente il n'est plus possible de concevoir de manière intuitive une stratégie expérimentale qui permette d'atteindre de façon rationnelle les objectifs fixés. Il faut alors remplacer la stratégie qui consiste à ne faire varier qu'un seul facteur à la fois par un plan d'expériences pour l'étude des effets des facteurs. On choisit dans ce cas de s'appuyer sur un modèle additif avec ou sans interactions pour traduire la/les réponse(s) observée(s).

### 1.2.7.4. Définition des facteurs

Après avoir précisé les objectifs d'une étude et les réponses les caractérisant il est nécessaire de définir les facteurs, c'est-à-dire les variables sur lesquelles l'expérimentateur va agir de manière à créer une variation de la/les réponse(s) qui sera restituée à travers un modèle.

Cependant lorsque l'objectif d'une étude est d'estimer puis de comparer les effets des facteurs la stratégie expérimentale conduit à postuler à un modèle additif préalablement à la construction d'un plan d'expériences adapté à l'objectif. En conséquence de quoi et d'après la définition de l'effet d'un facteur tous les paramètres de réglage mis en œuvre au cours du plan d'expériences seront considérés comme étant des variables quantitatives auxquelles on associe au moins deux états distincts appelés modalités.

Le nombre de facteurs indépendants utilisés dans l'étude est noté  $k$  et le nombre de modalités est noté  $m_i$  pour chaque facteur qualitatif  $i$ . La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée *niveau*. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur en général on limite ses variations entre deux bornes. La borne inférieure est le niveau bas et la borne supérieure est le niveau haut.

Le passage du plan d'expérimentation composé des valeurs utilisées pour les différents facteurs lors des essais à la matrice d'expérience composée des diverses modalités des facteurs s'illustre avec l'exemple d'une table 1 à trois facteurs (plan en carré gréco-latin) présenté dans la figure 3 :

Plan d'expérimentation			
essais	Température	Pression	Couple
1	25°C	1 MPa	5 Nm
2	25°C	3 MPa	10 Nm
3	70°C	1 MPa	10 Nm
4	70°C	3 MPa	5 Nm

Matrice d'expériences $\xi_N$			
essais	X1	X2	X3
1	A	A	A
2	A	B	B
3	B	A	B
4	B	B	A

**Figure 3.** Table de passage du plan d'expérience à la matrice d'expériences.

Comme nous le montre l'exemple de la figure 3 la matrice d'expérience est une entité mathématique présentée sous forme de tableau comportant autant de colonnes que de facteurs et autant de lignes que de combinaisons de modalités retenues dans le plan d'expériences.

Il est maintenant nécessaire de passer de la matrice d'expérience à la matrice du modèle. La matrice du modèle est notée  $X$  : c'est une matrice comportant autant de colonnes que d'inconnues dans le modèle et autant de lignes que la matrice d'expériences. La matrice du modèle permet la construction de nombreuses matrices dont les invariants ou les éléments permettent d'estimer la qualité de la matrice d'expérience retenue. On citera par exemple la matrice d'information définie par :

$$\text{Matrice d'information} = (X'X)$$

Pour passer de la matrice d'expériences à la matrice du modèle un codage des modalités des facteurs est nécessaire.

#### 1.2.7.5. Définition du domaine expérimental

La définition du domaine expérimental découle directement de l'étape précédente à savoir la définition des facteurs et leurs modalités. En effet le domaine est défini comme étant l'ensemble des combinaisons réalisables à partir des modalités des facteurs.

### 1.2.7.6. Construction du plan d'expériences

La construction d'un plan d'expériences pour l'étude des effets des facteurs peut s'appuyer sur deux grandes familles de critères :

- Les critères d'orthogonalité : la construction des plans se fait à partir de règles combinatoires.
- Les critères d'optimalité : la construction des plans se fait à partir de règles algorithmiques.

Parmi les plans construits à partir des règles d'orthogonalité les plus souvent rencontrés sont les plans en carré gréco-latin de Fisher (Fisher, 1935), les plans de Plackett et Burman (Plackett et Burman, 1946) ou les plans de Box et Hunter (Box-Hunter, 1962). Le but de ces plans est d'extraire du domaine expérimental généralement symétrique tout ou une partie des combinaisons des modalités des facteurs à partir de règles basées sur des permutations circulaires de manière à estimer avec une incertitude minimale les inconnues du modèle et les informations recherchées en terme d'effet des facteurs.

Les plans optimaux cherchent quant à eux à extraire du domaine expérimental généralement asymétrique un sous-ensemble des combinaisons des modalités des facteurs à partir de règles algorithmiques, de manière à estimer avec une incertitude minimale les inconnues du modèle et les informations recherchées en termes d'effet des facteurs. Ce type de plan nécessite l'utilisation d'un logiciel adapté. Historiquement, le premier critère utilisé pour la réalisation d'une matrice d'expérience fut le critère d'orthogonalité et ce pour plusieurs raisons exposées dans (Louvet, 2006) dont la simplicité de construction tout en offrant une incertitude minimale avec une facilité de mise en œuvre.

### 1.2.7.7. Expérimentation

Avant l'expérimentation il convient de préparer pour chacun des essais une fiche indiquant les modalités des facteurs à respecter.

### 1.2.7.8. Analyse globale des résultats d'essais

Avant de mettre en œuvre des outils mathématiques pour estimer les  $p$  inconnues du modèle et visualiser ensuite les effets moyens des facteurs et les éventuelles interactions il est important de porter un jugement global sur l'ensemble des résultats d'essais. L'analyse globale des résultats d'essais permet notamment :

- D'apprécier la variation des réponses observées au cours du plan d'expériences (c'est-à-dire de s'assurer d'un écart significatif entre les valeurs minimales et maximales de la réponse observée).
- De détecter des valeurs suspectes et procéder à une reproduction d'expérience le cas échéant.
- De repérer une combinaison des modalités des facteurs dont les résultats peuvent se révéler industriellement intéressants indépendamment de l'estimation et de la comparaison des effets des facteurs.

### 1.2.7.9. Analyse mathématique des résultats d'essais

L'analyse mathématique des résultats d'essais a pour objectif de calculer les coefficients du modèle. Cette analyse a été simplifiée grâce à l'outil informatique dédié à la construction et à l'analyse des plans d'expériences qui peut être un logiciel spécialisé, c'est le cas par exemple de Statistica<sup>®</sup> 7 ou encore grâce à une feuille de calcul programmée à l'aide de tableur informatique.

### 1.2.7.10. Analyse statistique du modèle

Elle se base sur les données de l'analyse mathématique son objectif est d'identifier les facteurs statistiquement influents sur la/les réponse(s) observée(s).

Dans ces cas une analyse de la variance semble être une méthode de choix qui étudie les différences des moyennes entre populations. Cette méthode doit son nom au fait qu'elle utilise des mesures de variance afin de juger de leurs caractères significatifs.

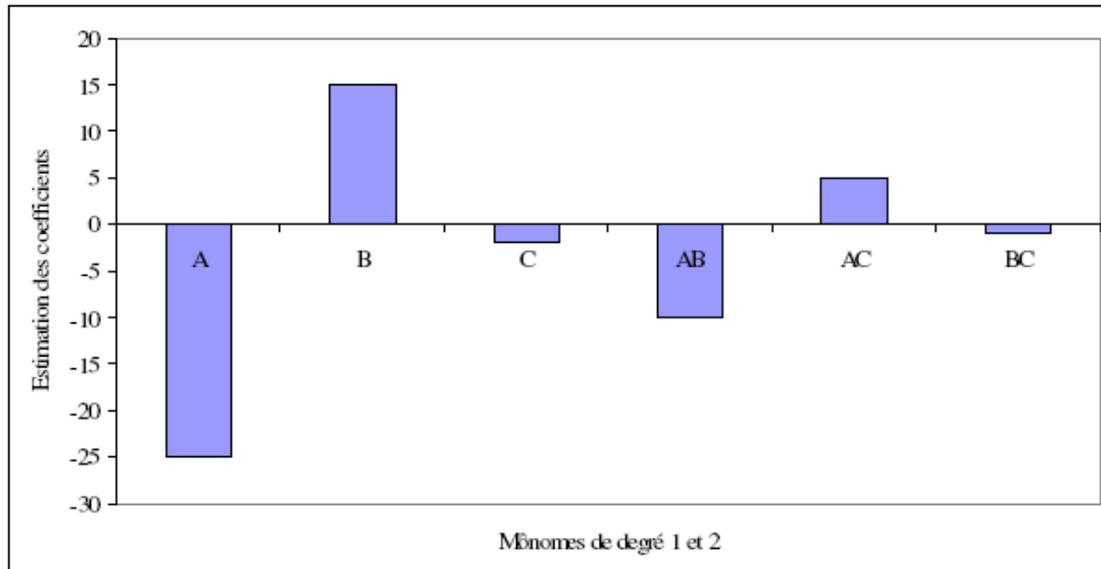
Il s'agit d'une généralisation à  $p$  populations du classique test de comparaison de deux échantillons le célèbre test de  $t$  de Student (Droesbeke *et al.*, 1997). Cette analyse permet de tester de manière absolue l'influence des facteurs sur les variations d'une réponse donnée (Vivier, 2002).

### 1.2.7.11. Analyse graphique du modèle

L'analyse graphique des résultats d'essais permet une restitution plus visuelle des résultats d'essais et de leur analyse.

#### Diagramme des coefficients

Le diagramme des coefficients est obtenu directement à partir des résultats de l'analyse mathématique des résultats d'essais. Les estimations des coefficients des monômes du premier degré traduisent les effets moyens des facteurs. Les estimations des coefficients des monômes du second degré présents dans le modèle sont représentatives de la nature des interactions. On utilise généralement un histogramme comme celui de la figure 4 pour représenter ces estimations.



**Figure 4.** Exemple de diagramme des coefficients pour un plan à 3 facteurs à 2 modalités

#### 1.2.7.12. Validation du modèle et des informations obtenues

Enfin la dernière étape d'une étude de screening concerne la validation du modèle qui est primordiale afin de capitaliser par la suite les résultats et les conclusions du plan d'expériences.

Une validation expérimentale des hypothèses doit toujours venir compléter et enrichir une analyse mathématique et statistique du modèle. Cette validation passe par la définition de nouveaux traitements expérimentaux. Ces derniers contribueront à conforter l'interprétation industrielle des premiers résultats.

#### 1.2.8. Méthode de surface de réponse

Nous avons vu précédemment qu'une étude de criblage permet à travers l'obtention d'un modèle additif d'identifier les éléments ayant une influence significative sur une réponse parmi une liste de facteurs. Une étude de surface de réponse quant à elle permet à travers un modèle polynomial le plus souvent de traduire les variations d'une réponse dans un domaine expérimental.

Les étapes à suivre dans le cas d'une étude de surface de réponse sont les mêmes que celles réalisées lors d'une étude de criblage. Cependant leur contenu est différent. En effet le modèle à établir lors d'une étude de surface de réponse n'a pas la même forme que celui recherché dans une étude de criblage. Or le contenu des étapes à suivre lorsqu'on mène une étude par plan d'expériences est étroitement lié à la forme du modèle recherché.

Nous allons maintenant décrire de manière théorique le contenu de chacune de ces étapes dans le cas d'une étude basée sur la méthode des plans d'expériences pour l'étude de surface de réponse avant de les appliquer à notre étude.

### 1.2.8.1. Notion de surface de réponse

Les niveaux  $x_i$  représentent les coordonnées d'un point expérimental et  $y$  est la valeur de la réponse en ce point. On définit un axe orthogonal à l'espace expérimental et on l'attribue à la réponse. La représentation géométrique du plan d'expériences à deux facteurs utilise un espace à trois dimensions pour être représenté : une dimension pour la réponse, deux dimensions pour les facteurs.

A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la surface de réponse (Figure 5).

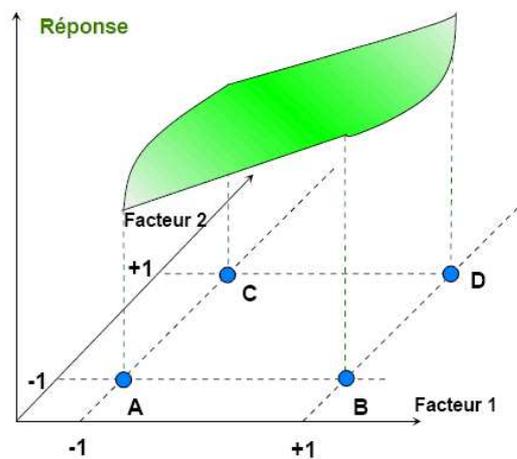


Figure 5. Représentation graphique d'une surface de réponse.

### 1.2.8.2. Définition du ou des objectif(s) de l'étude

Un grand nombre de problèmes industriels se pose souvent spontanément en termes d'optimisation. En effet on associe à la recherche d'une performance donnée la minimisation des coûts. L'objectif visé lors d'une étude de surface de réponse peut être de différentes natures (Goupy, 1999) :

- Optimiser (maximiser/minimiser) une ou plusieurs variables de réponse,
- Trouver un compromis satisfaisant entre plusieurs variables de réponse,
- Construire une cartographie de la variation d'une réponse dans un plan,
- Rechercher dans quelles proportions on peut mélanger des constituants préalablement choisis.

La recherche d'un optimum nécessite généralement d'avoir délimité au préalable une zone probable d'appartenance d'une solution au problème. C'est pourquoi une étude préliminaire des effets des facteurs (criblage) s'impose. N'oublions pas non plus qu'une telle étude préliminaire s'impose dès que le nombre de facteurs pris en compte est trop important, afin d'éviter un plan matériellement irréalisable.

### 1.2.8.3. Définition de la/les réponse(s) caractérisant l'objectif

La modélisation d'une surface de réponse à partir d'un polynôme approprié nécessite de disposer de réponses sous forme de grandeurs quantitatives à variation si possible continue. Le nombre de réponses est spécifique à chaque étude, on parle d'optimisation multicritères dès que l'on caractérise les objectifs d'un problème à partir d'au moins deux réponses (Goupy, 1999).

### 1.2.8.4. Choix d'une stratégie expérimentale

Dès lors que les objectifs et les réponses ont bien été définis il convient d'adopter une démarche pour atteindre le ou les objectifs fixés de la manière la plus efficace possible. Lorsqu'on est confronté à un problème d'optimisation deux grandes approches expérimentales peuvent être appliquées :

- Les méthodes directes consistent à converger séquentiellement vers un optimum local sans faire appel à une forme particulière de modélisation. Il s'agit par exemple de la méthode du simplexe et de ses différentes variantes proposées par (Walters *et al.*, 1991 ; Nelder, 1965 ; Spendley *et al.*, 1962). On cherche à chaque étape de s'éloigner du plus mauvais résultat.
- Les méthodes indirectes consistent à postuler a priori un modèle pour explorer un domaine expérimental dont les limites ont été fixées au préalable à partir de la plage de variation des facteurs. C'est l'interprétation du modèle sous forme numérique et/ou graphique qui permet d'obtenir des propositions de réglages permettant d'atteindre un optimum.

### 1.2.8.5. Définition des facteurs

Les plans d'expériences pour l'étude de surfaces de réponse nécessitent un nombre important d'essais à réaliser. D'après Louvet (2006) limiter volontairement la liste des facteurs sous prétexte d'un coût expérimental trop élevé représente un risque d'oubli d'une variable prépondérante pour l'optimisation. C'est pour cette raison qu'on passe d'abord par un plan de criblage afin de limiter leur nombre. La pratique industrielle de tels dispositifs restreint d'un point de vue pratique leur application à des domaines expérimentaux à un nombre de facteurs généralement inférieur ou égal à 5 (Droesbeke, 1997).

### 1.2.8.6. Définition des niveaux

La présence d'un optimum au sein d'un domaine expérimental se traduit par des dérivées partielles de la surface de réponse nulles, cela impose le choix d'un modèle du deuxième degré au minimum. La construction du plan nécessite donc 3 niveaux au minimum pour chacun des facteurs. Toutefois certains dispositifs expérimentaux comme les réseaux de Doehlert (1970) par exemple imposent parfois plus de trois niveaux aux facteurs. Il est donc intéressant d'intégrer les difficultés de modification des réglages des facteurs lors du choix d'un dispositif expérimental particulier.

### 1.2.8.7. Codage de la matrice d'expériences

On utilise une relation de codage unique définie à partir de la transformation bijective définissant la valeur  $x_i$  à partir de la relation suivante (Goupy, 1999) :

$$x_i = \frac{u_i - \left( \frac{u_{\max i} + u_{\min i}}{2} \right)}{\left( \frac{u_{\max i} - u_{\min i}}{2} \right)}$$

$u_{\max i}$  et  $u_{\min i}$  étant les bornes définies par l'utilisateur et  $u_i$  le niveau réel donné au facteur  $i$  lors de l'expérimentation.

Il s'agit d'une relation de centrage et de réduction de la variable  $u$ . Le numérateur de la relation précédente traduit un centrage par rapport au milieu de l'intervalle de variation des facteurs. Le dénominateur traduit une réduction par rapport à la moitié de l'étendue de ce même intervalle ainsi que des *points axiaux*. Ces points expérimentaux sont situés sur les axes de chacun des facteurs pour constituer un plan dit composite centré.

### 1.2.8.8. Définition du domaine expérimental

La nature quantitative continue des facteurs induit un nombre de combinaisons infini pour le domaine expérimental chacun des facteurs pouvant prendre un nombre infini de niveaux particuliers dans la plage de variations qui leur est associée (Droesbeke, 1997).

### 1.2.8.9. Définition du modèle empirique

On veut ici choisir une forme de modèle qui définit correctement les variations de la réponse. Le choix du modèle du second degré repose sur le fait que la recherche d'un optimum nécessite la présence d'une dérivée nulle et qu'il est toujours possible de définir au voisinage d'un point un développement en série de Taylor-McLaurin pour toute fonction (Goupy, 1999 ; Faucher, 2006).

On recherche donc classiquement un modèle de la forme :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i x_i + \sum_{i=0}^K \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=i+1}^K \beta_{ij} x_i x_j$$

Dans lequel  $\beta$  représente les coefficients du modèle à identifier ( $\beta_0$  la constante,  $\beta_i$  les coefficients associés aux facteurs,  $\beta_{ii}$  les coefficients associés aux termes quadratiques et  $\beta_{ij}$  les coefficients associés aux interactions d'ordre 1),  $k$  désigne le nombre de facteurs  $x_i$  pris en considération dans le modèle.

### 1.2.8.10. Construction du plan d'expériences

Une fois les facteurs clairement identifiés et la réponse connue on peut proposer un plan d'expérience c'est-à-dire une liste d'expériences à réaliser afin de cerner au mieux le phénomène étudié.

Afin de pouvoir ajuster plusieurs modèles polynomiaux il est possible d'utiliser un plan d'expérience très classique de type composite centré présenté dans le tableau 2. Ce plan d'expérience est constitué par un total de 17 expériences écrites ligne par ligne avec les niveaux des différents facteurs sous forme codée.

**Tableau 2.** Plan d'expérience de type composite centré.

Essai n°	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Un tel plan d'expérience est qualifié de composite car il est constitué de trois parties différentes utilisables pour divers types d'ajustements. La première partie (expériences 1 à 8) est la partie factorielle constituée par les 8 sommets du cube unité. La seconde partie (expériences 9 à 14) est la partie axiale constituée par des points sur les axes du repère utilisé. Tous ces points sont situés à une distance égale à 1,6818 du centre du repère (la valeur exacte étant en fait  $\frac{81}{4}$ ) dans le but d'obtenir la propriété classique d'iso-variance par transformations orthogonales. Il s'agit ici du choix proposé par défaut par le logiciel. Chacune de ces 6 expériences utilise donc pour un des facteurs des niveaux hors des valeurs de fonctionnement usuelles.

Enfin la dernière partie du plan composite (expériences 15 à 17) est constituée par une triple répétition de l'expérience qualifiée de centrale (avec tous les facteurs fixés à leur niveau moyen). Dans un contexte statistique il est intéressant de répéter plusieurs fois certaines expériences car la nature aléatoire du phénomène va entraîner que les réponses observées ne seront pas égales. Ceci permet de réaliser une analyse plus fine du phénomène étudié. L'usage des facteurs sous forme codée simplifie le travail d'analyse mais cette transformation est inutile pour l'utilisateur. C'est pourquoi il est courant d'éditer à la fois le plan d'expérience avec les facteurs codés et le plan d'expérience avec les facteurs exprimés dans leurs unités initiales. Cette seconde forme est souvent appelée **protocole expérimental**.

#### 1.2.8.11. Analyse statistique du modèle

L'équation du modèle empirique n'est qu'une approximation de la réalité. L'estimation des coefficients du modèle polynomial du second degré s'appuie sur des résultats d'essais qui sont des valeurs particulières d'une variable aléatoire.

La mise en œuvre de tests statistiques doit permettre de porter un jugement sur les résultats obtenus à savoir :

- Un modèle décrivant la variation de la réponse dans le domaine expérimental.
- Des estimations des coefficients associés aux différents monômes du modèle.
- Des résidus traduisant les écarts entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

#### 1.2.8.12. L'analyse du modèle dans sa globalité

Cette étape de l'analyse statistique aboutit à la construction du tableau d'analyse de régression et à la détermination de la qualité descriptive du modèle (Eriksson *et al.*, 2000; Droesbeke, 1997).

L'analyse de régression consiste à expliquer la variation totale de la réponse à partir de la somme des carrés des écarts entre les résultats d'essais et leur moyenne :

$$SCT = \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2$$

Cette quantité est indépendante du modèle postulé. On décompose ensuite cette somme de carrés en une somme de deux termes SCM et SCE. Le premier terme traduit la variation des réponses calculées autour de leur moyenne, soit encore :

$$SCM = \sum_{i=1}^N \left( \hat{y}_i - \bar{y} \right)^2$$

L'application de la méthode des moindres carrés utilisée pour la détermination des coefficients du modèle induit la relation :

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N y_i = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \hat{y}_i$$

Le second terme traduit la somme des carrés des résidus dont on sait qu'elle est minimale grâce à l'utilisation de la méthode des moindres carrés :

$$SCE = \sum_{i=1}^N \left( y_i - \hat{y}_i \right)^2$$

On vérifie immédiatement la relation suivante encore appelée équation d'analyse de variance ou équation d'analyse de régression :

$$SCT = SCM + SCE$$

L'analyse statistique du modèle dans sa globalité se poursuit par la construction d'un test statistique visant à affecter une probabilité à l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) qui dit que le modèle ne permet pas de décrire la variation des résultats d'essais. Il s'agit du test de comparaison du rapport de deux variances à une valeur donnée (NF X 06-063, 1987). On définit pour cela la statistique notée  $F_{obs}$  à partir de la relation :

$$F_{obs} = \frac{\frac{SCM}{p-1}}{\frac{SCE}{N-p}}$$

Les quantités  $(p-1)$  et  $(N-p)$  correspondent respectivement au nombre de degrés de liberté affectés à la somme des carrés associée au modèle ( $SCM$ ) et à la somme des carrés associés aux résidus ( $SCE$ ). Le rapport  $F_{obs}$  exprime donc le rapport entre les 2 variances. Pour le  $i^{\text{ème}}$  traitement du plan d'expériences la valeur observée  $y_i$  du résultat d'essai représente une valeur particulière de la variable aléatoire caractérisant la réponse pour ce traitement. Par voie de conséquence la statistique  $F_{obs}$  est elle-même une variable aléatoire dont les valeurs suivent une fonction de répartition théorique appelée loi de F ou loi de Snedecor.

On utilise cette loi pour savoir à partir de quelle valeur particulière appelée valeur critique le numérateur de la quantité  $F_{obs}$  est significativement supérieur au dénominateur.

On peut également à partir de cette même fonction de répartition affecter une probabilité  $P$  de rejeter à tort l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) énoncée ci-dessus. En comparant cette probabilité au seuil de significativité choisi on peut conclure quant à la véracité de l'hypothèse ( $H_0$ ).

Un tableau d'analyse de régression tel que celui présenté en table 1 permet de regrouper les différentes étapes permettant d'aboutir au calcul de cette probabilité.

**Tableau 3.** Tableau d'analyse de régression.

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	$F_{obs}$	Probabilité
Modèle	$SCM$	$p-1$	$SCM/(p-1)$	$F_{obs}$	$P$
Résidus	$SCE$	$N-p$	$SCE/(N-p)$		
Total	$SCT$	$N$			

Le calcul de la qualité descriptive d'un modèle à partir du coefficient de régression ajusté :

$$R_{ajusté}^2 = 1 - \frac{\frac{SCE}{N-p}}{\frac{SCT}{N-1}}$$

Plus la valeur du coefficient de régression est proche de 1 et plus la qualité descriptive du modèle est satisfaisante.

### 1.2.8.13. Analyse graphique du modèle

Différents graphiques sont disponibles pour restituer de manière interprétable l'équation du modèle empirique. Dans le contexte des plans d'expériences pour l'étude des surfaces de réponse cette restitution s'effectue essentiellement sous deux formes de surfaces de réponse et de courbes iso-réponse. Toutefois avant de se livrer à la représentation graphique il est important de porter un jugement sur la qualité descriptive du modèle empirique ; la construction d'un graphe d'adéquation permet d'atteindre cet objectif.

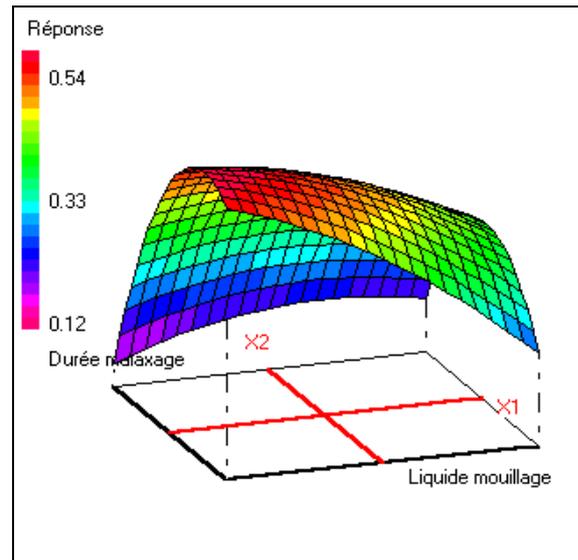
#### 1.2.8.13.1. Graphe d'adéquation du modèle

La construction du graphe d'adéquation du modèle repose sur un nuage de points qui matérialise en abscisse la variation de la réponse mesurée et en ordonnée la variation de la réponse calculée à partir du modèle obtenu.

La représentation de la première bissectrice permet de porter visuellement un jugement sur l'alignement des points : plus le nuage est proche de cette première bissectrice, plus le modèle décrit convenablement la variation des résultats d'essais. La construction d'un graphique d'adéquation permet donc une représentation graphique de la qualité descriptive  $R_{ajusté}^2$  du modèle.

#### 1.2.8.13.2. Surfaces de réponse

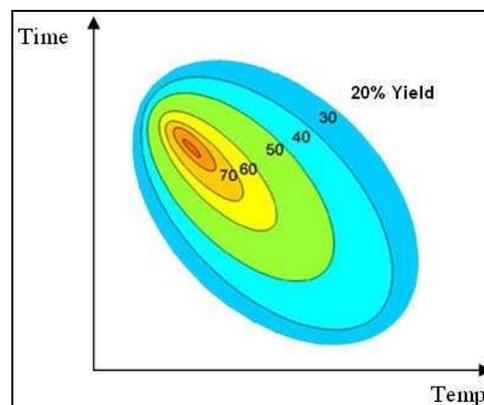
La surface de réponse comme celle présentée en figure 6 matérialise la surface de régression à partir d'un graphique dans un espace à trois dimensions. Le plan horizontal de la figure matérialise le domaine de variation de 2 facteurs ; l'axe vertical matérialise la variation de la réponse à partir du modèle. Au-delà de 2 facteurs il est nécessaire de maintenir à un niveau constant les facteurs dont les variations ne sont pas décrites dans le plan horizontal.



**Figure 6.** Exemple de représentation graphique de surface de réponse.

### 1.2.8.13.3. Courbes iso-réponse

Les courbes iso-réponses comme celle présentée en figure 7 constituent une projection de la surface de réponse dans le plan horizontal. Elles s'interprètent comme les courbes de niveau dessinées sur une carte topographique. Tout comme pour les surfaces de réponse cette représentation ne fait intervenir que 2 facteurs à la fois les autres devant être fixés à un niveau constant.



**Figure 7.** Exemple de représentation graphique de courbes iso-réponse.

### 1.2.8.14. Validation du modèle et des informations obtenues

La validation du modèle est primordiale afin de capitaliser par la suite les résultats et les conclusions du plan d'expériences.

**1.2.8.15. Recherche des conditions optimales**

Après l'obtention des résultats le meilleur modèle au sens des moindres carrés permet d'écrire la réponse moyenne prédite sous la forme suivante :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

En éliminant les effets jugés non significatifs ceci permet de manipuler plus facilement l'expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire.

La problématique est la recherche de l'extremum d'une fonction de plusieurs variables sous la contrainte de rester dans le domaine expérimental. Tout point critique d'une telle fonction (tout point annulant les dérivées partielles) a pour coordonnées  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  solutions du système d'équations :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1}(x_1, x_2, x_3) = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2}(x_1, x_2, x_3) = 0 \\ \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_3}(x_1, x_2, x_3) = 0 \end{array} \right.$$

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Isolement et purification des bactéries de Yaourt

#### 2.1.1. Echantillonnage de yaourt.

Pour l'isolement des deux bactéries lactiques de yaourt, nous avons choisi quatre marques de yaourts différentes, qui sont fabriquées et commercialisées par des firmes leaders en Algérie, il s'agit de :

1. La filiale Danone Djurdjura Algérie :



2. La laiterie Soummam d'Akbou :



3. SARL Hodna Lait de M'sila :



4. Le Trèfle de Blida :



#### 2.1.2. Milieux de culture

##### 2.1.2.1. Le milieu M17

Ce milieu décrit par Terzaghi et Sandine (1975), a été utilisé pour la culture des coques lactiques, lequel est constitué d'une solution de base et d'une solution de lactose. Le milieu M17 solide est obtenu par addition de 15 g/l d'Agar-agar.

- **Solution de base pour un litre de milieu**

Peptone tryptique de caséine	2.5g
Peptone pepsique de viande	2.5g
Peptone papainique de Soja	5.0g
Extrait de levure	2.5g
Extrait de viande	5.0g
$\beta$ - glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0.25g
Acide ascorbique	0.5g
Eau distillée qsp	950ml

Le pH du milieu a été ajusté à 7.2 et la stérilisation a été effectuée à 120 °C pendant 20 minutes.

- **Solution de lactose.**

Lactose	5.0g
Eau distillée qsp	50ml

Cette solution a été stérilisée à 110 °C pendant 10 minutes.

Après stérilisation les deux solutions ont été mélangées stérilement.

### 2.1.2.2. Le milieu MRS

Ce milieu décrit par De Man *et al.* (1960) a été utilisé pour la culture des *Lactobacillus bulgaricus*, et il est constitué des ingrédients suivants :

Peptone	<b>10.0g</b>
Extrait de viande	10.0g
Extrait de levure	5.0g
Glucose	20.0g
Tween 80	1.08g
Phosphate dipotassique	2.0g
Acétate de sodium	5.0g
Citrate d'ammonium	2.0g
Sulfate de magnésium	0.20g
Sulfate de manganèse	0.05g
Eau distillée qsp	1000ml

Le pH a été ajusté à 5.4 et la stérilisation a été effectuée à 115 °C pendant 20 minutes. Le milieu MRS solide a été obtenu par addition de 15 g/l d'Agar-agar.

### 2.1.2.3. Lait écrémé.

Nous avons utilisé tout au long de notre travail du lait écrémé commercialisé par la firme **Candia** sous le nom de **Silhouette**, ce milieu a été utilisé pour la culture des bactéries sans stérilisation préalable car c'est un lait UHT (un lait stérilisé par traitement à haute température de longue conservation), et cela a été confirmé par l'ajout systématique d'un témoin incubé avec chaque culture.

### 2.1.3. Dénombrement et isolement de bactéries lactiques de yaourt.

Des séries de dilutions décimales des échantillons de yaourt ont été effectuées dans de l'eau physiologique stérile. Les milieux de cultures de dénombrement et d'isolement ont été ensemencés à partir des dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ .

Le coques lactique est mis en évidence sur milieu M17 gélosé (Terzaghi et Sandine, 1975), et le lactobacille sur milieu M.R.S. gélosé (De Man *et al.*, 1960) dont le pH a été ajusté à 5,4. Trois boîtes de Pétri par dilution ont été ensemencées par milieu.

Le dénombrement des bactéries a été évalué, après incubation à 37 °C durant 48 heures, en nombre de colonies par millilitre d'échantillon de yaourt analysé. Les boîtes de Pétri ensemencées sur milieu M.R.S ont été incubées en condition d'anaérobiose.

## **2.1.4. Caractérisation des isolats**

### **2.1.4.1. Examens micro et macroscopique.**

Les colonies obtenues ont été examinées tout d'abord macroscopiquement, leurs aspects ont été observés afin de déterminer leurs caractères cultureux (couleur, forme et aspect). Un examen microscopique a été réalisé à l'aide de la coloration de Gram pour observer la morphologie et la disposition de ces bactéries ainsi que leur Gram.

### **2.1.4.2. Tests biochimiques et physiologiques**

Une série de tests biochimiques et physiologiques ont été effectués pour les souches isolées afin de confirmer l'appartenance de celles-ci au groupe des bactéries lactiques, il s'agit de:

- l'activité catalasique, qui a été mise en évidence en émulsionnant une colonie de la culture dans de l'eau oxygénée à 10 volumes pour observer la production de gaz par effervescence.
- la capacité de croître à différentes températures qui a été appréciée à : 37, 42 et 45°C.
- l'aptitude à croître sur les milieux M17 et MRS en présence de NaCl à différentes concentrations (2 et 4% de NaCl) qui a été observée pendant 2 à 3 jours d'incubation.

### **2.1.5. Conservation des souches.**

Les souches isolées ont été conservées à – 20°C sur le lait écrémé stérile ainsi que sur les milieux M17 et M.R.S additionnés de glycérol pour des périodes prolongées (plusieurs mois), par contre pour des conservations à moyen terme (quelques semaines), les souches ont été conservées à 4°C en gélose (M17, M.R.S) inclinée.

### **2.1.6. Cinétique de croissance bactérienne.**

Nous avons suivi la croissance des souches sur milieu M17 pour les coques lactiques et sur milieu M.R.S pour les lactobacilles ainsi que sur le milieu naturel qui est le lait écrémé stérile, en culture simple puis en culture mixte, afin de déterminer les différentes phases de croissance et de sélectionner le couple de bactéries compatible et performant pour la suite de notre étude.

A cet effet, 200 ml de lait écrémé ou de milieu de culture stérile (M17, M.R.S) ont été ensemencés avec des pré-cultures effectuées dans le même milieu pour les isolats à raison de 1% du volume de base et portés à incubation au bain marie à 42°C.

À chaque intervalle de temps régulier de 60 min, la DO (densité optique) est mesurée à la longueur d'onde  $\lambda = 600$  nm. Dans le cas de lait écrémé, cette lecture a été précédée d'une étape de transparisation par une solution d'EDTA à pH=12 comme décrit par (Boutrou *et al.*, 1998).

## 2.2. Optimisation de la fabrication de yaourt par l'application des plans d'expériences

### 2.2.1. Application de la méthode de criblage

Nous avons dans la partie synthèse bibliographique présenté de manière théorique la démarche à suivre lors d'une étude de criblage par plan d'expériences. Cette démarche par étape va maintenant être appliquée à notre étude afin de limiter le nombre de facteurs à prendre en compte dans la modélisation des performances observées.

#### 2.2.1.1. Définition des objectifs et des réponses

Le but de cette première étude a été d'estimer l'effet des facteurs identifiés comme potentiellement influents et d'identifier ceux ayant une influence statistiquement significative sur les performances observées.

Les réponses observées dans ce travail ont été la concentration de l'acide lactique produit et la texture du yaourt en fin de fermentation.

#### 2.2.1.2. Dosage de l'acide lactique.

Ce dosage a été effectué après 10h d'incubation en lait écrémé pour les deux souches sélectionnées selon le plan d'expérience décrit en (2.2.1.5 & 2.2.2.2). Le degré d'acidité du milieu a été exprimé en °D « degré dornic » : **1 D°** correspond à **0.1 g** d'Acide lactique par litre de lait.

#### Mode opératoire.

À 10 ml d'échantillon de lait à doser, on a ajouté quelques gouttes de phénolphtaléine et par la suite on a titré avec une solution de NaOH à N/9 placée dans une burette jusqu'au virage de la coloration au rose correspondant à la zone d'équivalence. On a noté le volume équivalent ( $V_{eq}$ ) correspondant au volume de la solution de NaOH versé. La concentration d'acide lactique contenu  $C_0$  (g/l) dans un litre de lait a été calculé comme suit :

$$C_0 = C_1 \times V_{eq} \times M_{ac} / V_0 \text{ (g/l)}$$

Où on a :

$$C_1 = [\text{NaOH}] = \text{N}/9$$

$V_{eq}$  = volume de NaOH qui correspond à la zone de virage au rose.

$M_{ac}$  = masse molaire de l'acide lactique = 90 g /mol

$V_0$  = volume initiale de l'échantillon de lait = 10 ml

Calcul du degré Dornic « ° D » : **D = C<sub>0</sub> / 0.1**

### Appréciation de l'aspect du yaourt

L'appréciation de la fermeté, de la consistance et de l'aspect du coagulum a été réalisée en instaurant un système de score allant de 0 à 10/10. Après incubation suivant l'aspect du yaourt obtenu, cette appréciation a été faite selon la grille suivante :

**Tableau 4.** Grille des scores pour l'appréciation de la fermeté, de la consistance et de l'aspect du coagulum

score	Aspect de coagulum	Observation
<b>00/10</b>	Liquide (non coagulé)	Très insuffisante
<b>02/10</b>	± Liquide (non coagulé)	Très insuffisante
<b>04/10</b>	coagulé (une légère et longue coagulation)	Très insuffisante
<b>06/10</b>	coagulé (une légère coagulation)	Insuffisante
<b>08/10</b>	± ferme (coagulation normale)	Correcte
<b>10/10</b>	Ferme (coagulation normale et correcte)	Très correcte

#### 2.2.1.3. Définition des facteurs

L'étape de définition des facteurs a permis d'identifier 5 facteurs potentiellement influents sur les réponses observées, il s'agit de :

- La température d'incubation
- La quantité de poudre de lait ajoutée
- La quantité de sirop glucosé ajoutée
- La taille d'inoculum
- Le ratio cocci/bacille

Ce choix a été fait en se basant sur les facteurs influençant la croissance et l'acidification des deux bactéries lactiques recensés lors de l'analyse bibliographique.

#### 2.2.1.4. Définition du domaine expérimental

Le domaine expérimental a été constitué de l'ensemble des combinaisons de facteurs qu'il a été possible de réaliser. Dans notre cas nous étudions 5 facteurs pourvus d'un même nombre de modalités (niveaux), à savoir les deux valeurs extrêmes (minimum et maximum) pour chaque facteur, représentés par le codage [-1, +1]. Le tableau 5 résume les différentes modalités des facteurs.

**Tableau 5.** Représentation des différentes modalités des facteurs du plan de criblage.

Niveau des facteurs	(niveau bas) -1	(niveau haut) +1
Température (°C)	35	45
Lait en poudre (%)	0	5
Le ratio cocci/bacille	0.5	2.5
La taille d'inoculum (%)	1	5
Sirop glucosé (%)	0	10

### 2.2.1.5 Construction du plan d'expérience

Il s'agit d'un plan à 8 essais conçu pour 5 facteurs et 2 niveaux (min, max). La matrice d'expérience est celle fournie dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Le plan de criblage à 8 essais conçu pour 5 facteurs et 2 niveaux (min, max).

Essai n°	Température (°C)	Lait en poudre (% m/v)	Ratio cocci/bacille	Taille d'inoculum (% v/v)	Sirop Glucosé (v/v%)
1	-1	-1	-1	+1	+1
2	-1	+1	-1	-1	+1
3	-1	-1	+1	+1	-1
4	+1	+1	-1	+1	-1
5	+1	+1	+1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	+1	-1	-1	-1	-1
8	-1	+1	+1	-1	-1

On retrouve dans cette matrice les 5 colonnes associées aux 5 facteurs.

### 2.2.1.6. Expérimentation

Chaque essai a été conduit comme indiqué sur le tableau du plan d'expérience, en respectant la valeur décodée de chaque facteur. Les mixtures du yaourt ont été préparées en mélangeant les ingrédients selon le plan d'expérience. Ces dernières ont été homogénéisées puis stérilisées (étape du traitement thermique à 115°C pendant 5minutes), ensuite refroidies.

Le lait a étéensemencé avec les souches de lactobacilles et des coques lactiques et a été porté à incubation aux bains marie selon le plan d'expérience décrit au paragraphe n°2.2.1.5.

Les réponses ont été évaluées après 10 heures d'incubation pour chaque essai, à savoir la concentration d'acide lactique produit et la texture du yaourt fini selon le mode opératoire déjà décrit précédemment au paragraphe n°2.2.1.2.

## 2.2.2. Application de la méthode de surface de réponse

L'application des techniques de criblage a permis d'identifier les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur l'acidité et la texture du yaourt. Cette limitation du nombre de facteurs a eu pour conséquence directe la réduction du nombre de coefficients à déterminer dans les modèles et de ce fait réduire le nombre d'expériences à réaliser.

Nous allons reprendre les différentes étapes de la méthodologie des plans d'expérience pour l'étude des surfaces de réponses présentées préalablement dans la partie synthèse bibliographique et les mettre en pratique dans notre application.

### 2.2.2.1. Définition des facteurs

L'étude de criblage présentée a permis d'identifier 3 facteurs ayant une influence statistiquement significative sur l'une et/ou l'autre des réponses observées. Ces facteurs sont :

- La température d'incubation
- La quantité de poudre de lait ajoutée
- La quantité de sirop glucosé ajoutée

La modélisation sera donc effectuée en fonction de ces 3 facteurs. Pour les deux autres facteurs jugés statistiquement non significatifs, la taille d'inoculum et le ratio cocci/bacille, leurs valeurs ont été fixées à 2% pour le taux d'ensemencement et a 1 :1 pour le rapport entre coques lactiques et lactobacilles.

### 2.2.2.2. Définition du domaine expérimental

Nous avons vu que le modèle recherché lorsqu'on utilise la méthode des plans d'expérience composite centré pour l'étude de surface de réponse est un polynôme du second degré et que par conséquent chacun des facteurs doit être doté de 5 modalités (niveaux).

Le tableau 7 résume les différentes modalités des facteurs.

**Tableau 7.** Représentation des différentes modalités des facteurs du plan composite centré.

Niveau des facteurs	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Température (°C)	31.6	35	40	45	48.5
Lait en poudre (%)	0.04	2	5	8	10.04
Sirop glucosé (%)	0.62	3	6.5	10	12.38

### Construction du plan d'expérience

Il s'agit d'un plan d'expérience de type composite centré réduit. Ce plan est constitué d'un total de 17 expériences conçu pour 3 facteurs variés à 5 niveaux.

Le premier bloc de ce plan (expériences de 1 à 8) est un plan factoriel normal. Le second bloc (expériences de 9 à 14) est la partie axiale dite expériences en position étoile qui correspond aux points axiaux  $+\alpha$  et  $-\alpha$ . Enfin le dernier bloc du plan composite (expériences de 15 à 17) est constitué par plusieurs répétitions de l'expérience qualifiée de centrale où tous les facteurs sont fixés à leur niveau moyen. Dans notre cas, nous avons utilisé 3 répétitions au centre. Le Tableau 8, résume la matrice d'expérience (plan d'expérience) adoptée pour notre étude.

**Tableau 8.** Matrice d'expériences de notre étude expérimentale en valeurs codées.

Essai n°	Température (°C)	Lait en poudre (% m/v)	Sirop de saccharose (v/v%)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

## Expérimentation

Chaque essai a été conduit comme indiqué sur le tableau du plan d'expérience, en respectant la valeur décodée de chaque facteur. Nous avons procédé de la même manière que le plan de criblage pour le mélange des ingrédients, le traitement thermique et enfin la fermentation.

Les réponses ont été estimées après 10 heures d'incubation en évaluant la concentration d'acide lactique produit et la texture du yaourt fini selon le mode opératoire déjà décrit précédemment. Chaque essai a été réalisé 3 fois.

### 2.2.2.3. Méthode d'analyse mathématique des résultats

Chaque point expérimental a permis d'obtenir une valeur de la réponse. Cette réponse a été modélisée par un polynôme dont les coefficients sont les inconnues qu'il faut déterminer. A la fin du plan d'expériences on a eu un système de  $n$  équations (s'il y a  $n$  essais) à  $p$  inconnues (s'il y a  $p$  coefficients dans le modèle choisi à priori).

Ce système possède un nombre d'équations inférieur au nombre d'inconnues. Il y a  $n$  équations et  $p + n$  inconnues. Pour le résoudre, on utilise une méthode de régression basée sur le critère des moindres carrés. On a obtenu ainsi les estimations des coefficients que l'on a noté :

$$\hat{\beta}$$

Le résultat de ce calcul a été :

$$\hat{\beta} = (\mathbf{X}' \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}' \mathbf{y}$$

Avec :

- $\mathbf{X}$  est la matrice de calcul, ou matrice du modèle qui dépend des points expérimentaux choisis pour exécuter le plan et du modèle postulé.
- $\mathbf{X}'$  est la matrice transposée de  $\mathbf{X}$ .

De nombreux logiciels exécutent ce calcul et donnent directement les valeurs des coefficients recherchés.

Deux matrices interviennent constamment dans la théorie des plans d'expérience :

- La matrice d'information  $\mathbf{X}'\mathbf{X}$ .
- La matrice de dispersion  $(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}$ .

### **Méthode d'analyse statistique des résultats**

Au cours de notre travail nous avons utilisé comme outil informatique le logiciel Statistica<sup>®</sup> pour l'analyse statistique des résultats. C'est un logiciel statistique interactif, complet, rapide, graphique et efficace grâce à ses langages de programmation.

Ce logiciel nous a permis de recalculer les coefficients des facteurs pour les comparer à ceux calculés à partir de la méthode mathématique. L'analyse statistique de ce modèle conduit dans un premier temps à la table d'analyse de la variance.

Le logiciel peut aussi éditer le "tableau des résidus" permettant de juger de manière plus précise de la qualité de l'ajustement réalisé. La comparaison entre les colonnes " $Y^{exp}$ " (réponses mesurées) et " $Y^{est}$ " (réponses prédites par le modèle) précise si l'ajustement est de bonne qualité. Les autres colonnes proposées par ce logiciel évaluent la différence entre les réponses mesurées et celles prédites (colonne "Différence") et font subir un certain nombre de transformations à ces valeurs, afin de les rendre statistiquement plus faciles à interpréter.

#### **2.2.2.4. Méthode d'analyse graphique du modèle**

Les représentations graphiques des résultats et leur analyse ont été effectuées par ce même logiciel Statistica<sup>®</sup>.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Isolement et caractérisation des bactéries

A partir de 4 échantillons de yaourt, nous avons obtenu 60 isolats (20 isolats par échantillon de yaourt) à partir desquels 5 isolats ont été retenus (3 coques et 2 lactobacilles), tous à Gram positif et catalase négative. Le reste des isolats ne correspondaient pas aux bactéries recherchées ceci a été confirmé grâce à l'étape de caractérisation des souches décrite dans le paragraphe suivant selon lequel les isolats écartés possèdent une enzyme, la catalase, dont les bactéries lactiques sont dépourvues.

Après sélection des colonies, nous avons procédé à la purification des souches par la méthode des stries.

#### 3.2. Caractérisation des souches obtenues

Les souches retenues pour notre étude sont au nombre de 5, il s'agit des souches : *Ys1*, *Ys3*, *Ys4*, *Yb2* et *Yb4*.

*Y* : yaourt

*s* : coque lactique

*b* : bacille lactique

**1** : le premier échantillon de yaourt, fabriqué par la firme « **Soummam** », à partir duquel la bactérie a été isolée.

**2** : le deuxième échantillon de yaourt, fabriqué par la firme « **Danone** », à partir duquel la bactérie a été isolée.

**3** : le troisième échantillon de yaourt, fabriqué par la firme « **Trèfle** », à partir duquel la bactérie a été isolée.

**4** : le quatrième échantillon de yaourt, fabriqué par la firme « **Hodna** », à partir duquel la bactérie a été isolée.

##### 3.2.1. Examen macroscopique.

Les colonies observées sur le milieu M17 étaient de petite taille, blanchâtres, de surface lisse plus ou moins bombées et à contour régulier.

Les colonies observées sur le milieu MRS étaient plus grandes que les précédentes et se caractérisent par une couleur claire avec un centre foncé à contour irrégulier.

##### 3.2.2. Examen microscopique.

La coloration de Gram des cellules à partir des colonies obtenues en milieu M17 a montré que les bactéries sont à Gram-positif de forme sphérique et qui s'associent en paires ou en chaînettes. Les cellules des colonies obtenues sur milieu MRS ont montré que les bactéries sont aussi à Gram-positif, en forme de bâtonnet, isolées ou en courtes chaînes.

##### 3.2.3. Recherche de la Catalase.

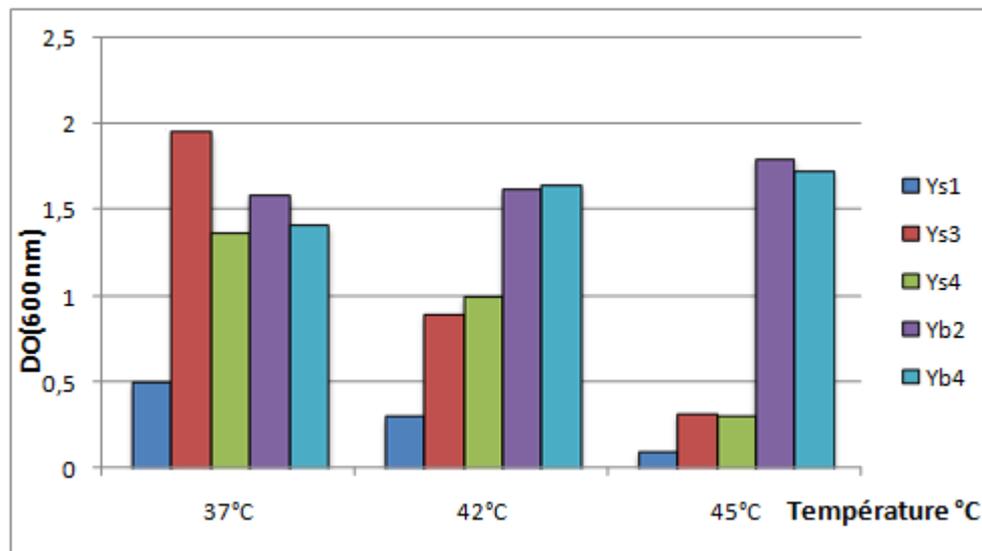
Le test de catalase se révèle négatif donc nos souches sont dépourvues de cette enzyme c'est ce qui prouve leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

### 3.2.4. Croissance sur milieu additionné de NaCl.

Nous avons noté une croissance des coques lactiques sur le milieu M17 liquide à 2 et 4% de NaCl, et une absence de croissance sur le milieu MRS avec les mêmes concentrations de NaCl pour les lactobacilles.

### 3.2.5. Température de croissance.

Après 24 heures de culture des souches sur le milieu M17 pour les coques lactiques et sur le milieu MRS pour les lactobacilles à trois températures différentes (37, 42 et 45°C), nous avons mesuré la densité optique des trois cultures, les résultats sont présentés dans la figure suivante :



**Figure 8.** Représentation des différentes températures testées pour la croissance des souches bactériennes.

A l'examen des histogrammes obtenus, nous avons constaté que la densité optique mesurée est proportionnelle à la masse microbienne présente dans l'échantillon à mesurer. Ces résultats nous ont permis de confirmer que les souches de coques lactiques obtenues ont une croissance meilleure à 37°C, alors que les souches de lactobacilles à 45°C. De ce fait nous avons choisi et retenu la température de 42°C, comme température médiane entre ces deux bornes afin de suivre la cinétique de croissance des souches.



**Photo 1.** Tubes de culture sur lait des souches bactériennes et du témoin.

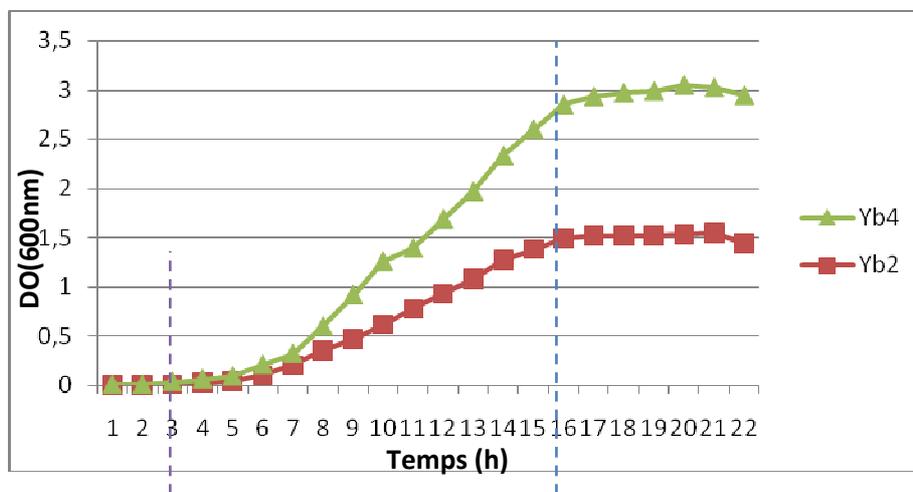
### 3.3. Cinétique de croissance bactérienne.

L'évolution de la croissance des cinq souches sur milieu synthétique et sur lait écrémé stérile a été déterminée par le suivi de l'évolution de la densité optique mesurée directement à partir de la culture en milieu synthétique et après transparisation à partir de la culture en milieu naturel (lait) par l'EDTA à chaque heure à la longueur d'onde  $\lambda = 600 \text{ nm}$ .

La culture des cinq souches sur les deux milieux nous a permis de définir les différentes phases de croissance ainsi que la sélection des souches les plus performantes.

La culture mixte sur lait écrémé nous a permis de sélectionner les souches les plus compatibles de coques et lactobacilles pour continuer notre étude expérimentale.

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement dans les figures 9 et 10 pour les cultures simples et la figure 11 pour la culture mixte.



**Figure 9.** Cinétique de croissance des deux souches de lactobacille sur milieu MRS.

La croissance des deux souches de lactobacilles se déroule en plusieurs étapes, elle est initiée par une phase de latence plus ou moins longue (environ 3 heures), suivie par une phase de croissance exponentielle qui dure environ 12 heures, ensuite nous observons un ralentissement de la croissance au bout de 15 heures d'incubation aboutissant à une phase stationnaire caractérisée par une densité maximale de la population microbienne.

Nous avons aussi constaté que la souche *Yb4* a montré une meilleure croissance par rapport à la souche *Yb2*.

La cinétique de croissance des trois souches de coques est donnée à la figure 10 dont peut constater que la aussi, ces bactéries débutent tout d'abord leur croissance par une phase de latence qui dure environ une heure, suivie par la suite par une phase exponentielle qui dure environ 5 heures, et enfin une phase stationnaire après la 6<sup>ème</sup> heures d'incubation. À l'examen de ces courbes de croissance, il s'avère clairement que la souche *Ys4* est la plus performante, suivie par la souche *Ys3*.

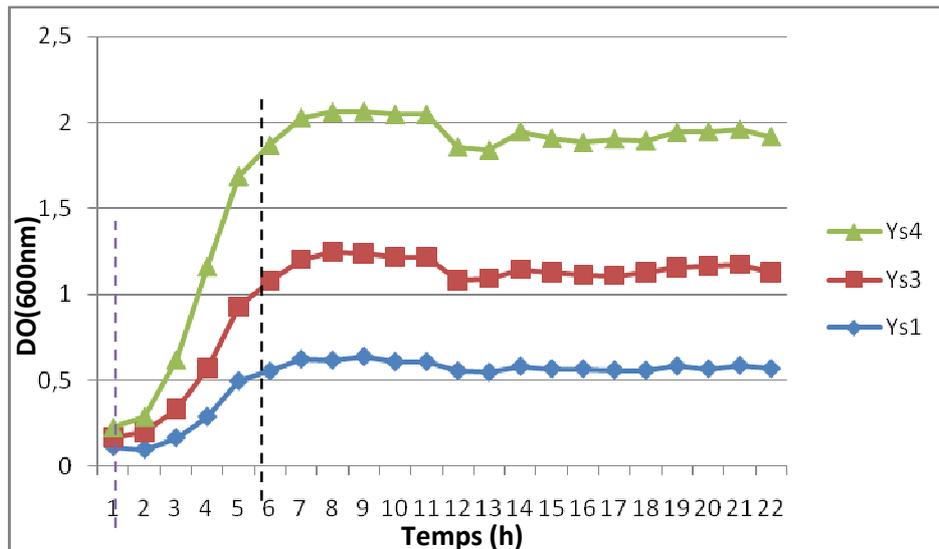


Figure 10. Cinétique de croissance des trois souches de coques sur milieu M17.

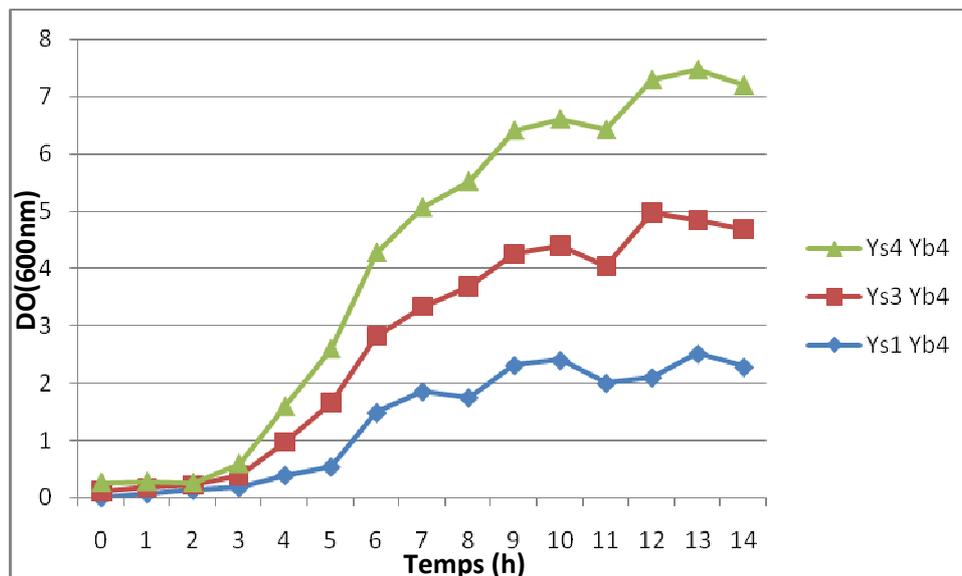


Figure 11. Cinétique de croissance des quatre souches en culture mixte sur lait.

La figure 11 représente les courbes de la cinétique de croissance des cinq souches en culture mixte sur lait. En comparant ces courbes nous remarquons que la phase de latence est plus courte dans la culture mixte que pour la culture simple avec une biomasse plus importante en culture mixte. Nous constatons clairement que le couple de souches *Ys4* et *Yb4* présente un profil de croissance le plus intéressant parmi les autres couples de souches testées.

Le niveau de croissance des souches en cultures mixtes s'avère nettement amélioré en comparaison avec celui en culture simple, ce qui est la résultante d'un phénomène bien connu chez ces bactéries qui est la proto-coopération.

En résumé des résultats de cette étude de la cinétique de croissance on peut dire que :

- la phase de latence est plus longue pour les lactobacilles que pour les coques lactiques, ce qui peut être attribuée aux besoins nutritionnels des lactobacilles.
- la phase exponentielle pour les lactobacilles en culture pure est plus longue que pour les coques lactiques, cet arrêt rapide de la croissance des cocci est dû à l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu, alors que les bâtonnets résistent plus au pH bas.
- en culture mixte, la biomasse est plus importante comparée à la culture pure.
- il y a deux souches plus performantes que les autres, ces souches ont eu une croissance plus importante aussi bien en culture simple qu'en culture mixte, cette performance en culture mixte est sûrement due au fait qu'elles sont issues du même yaourt qui est l'échantillon n°4 « **Hodna** ». Cette étude va être poursuivie par l'utilisation de ces deux bactéries à savoir le coque lactique **Ys4** et le lactobacille **Yb4**.

### 3.4. Optimisation de la fabrication de yaourt par l'application des plans d'expériences

#### 3.4.1. Résultats après application de la méthode de criblage

Après avoir défini l'objectif et les réponses recherchées lors de notre étude qui est la concentration en acide lactique produit et l'aspect du yaourt et après avoir déterminé les facteurs jugés influençant la fabrication du yaourt, nous avons défini le domaine expérimental, ensuite nous avons construit le plan d'expérience que nous avons suivi pour conduire chaque essai selon les valeurs décodées de chaque facteur.

Le plan d'expérimentation ou le protocole expérimental ainsi que les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 9.** Plan expérimental de criblage et résultats d'essais obtenus.

Essai N°	Température (°C)	Lait en poudre (% m/v)	Ratio cocci/bacille	Taille d'inoculum (% v/v)	Sirop Glucosé (% v/v)	Concentration d'acide lactique (g/l)	Aspect du yaourt après (x/10)
1	35	0	0,5	5	10	7,38	4
2	35	5	0,5	1	10	9,27	8
3	35	0	2,5	5	0	7,74	6
4	45	5	0,5	5	0	9,99	10
5	45	5	2,5	5	10	8,19	10
6	45	0	2,5	1	10	7,47	8
7	45	0	0,5	1	0	8,64	8
8	35	5	2,5	1	0	9,36	8

#### 3.4.2. Analyse globale des résultats

D'après les résultats obtenus on peut déduire à première vue l'effet positif de la température sur la texture du yaourt, on remarque qu'à 45°C nous avons eu les meilleurs résultats et que la quantité de lait en poudre rajouté influence positivement la concentration d'acide lactique produit lors de la fermentation.

#### 3.4.3. Analyse statistique des résultats d'essais

Les résultats d'essai ont été traités par le logiciel Statistica<sup>®</sup> 7 afin de déterminer les effets des 5 facteurs sur les 2 réponses, ainsi que le calcul de *p* value qui permet de juger si les facteurs ont une influence statistiquement significative sur les réponses.

Si *p* < 0,05 alors le facteur a une influence statistiquement significative sur la réponse.

**Tableau 10.** Estimation des coefficients du modèle relatif aux deux réponses (acide lactique produit et l’aspect du yaourt)

Réponses	Acide lactique produit		Aspect du yaourt	
	Effets	Valeurs <i>p</i>	Effets	Valeurs <i>p</i>
Température (°C)	0,135000	0,513336	2,500000	<b>0,037750 *</b>
Lait en poudre (%)	1,395000	<b>0,014755 *</b>	2,500000	<b>0,037750 *</b>
Ratio cocci/bacille	-1,630000	0,066667	0,500000	0,422650
Taille d’inoculum (%)	-0,360000	0,170439	-0,500000	0,422650
Sirop glucosé (%)	-0,855000	<b>0,037898 *</b>	-0,500000	0,422650

Le signe (\*) représente le caractère significative des facteurs avec  $p < 0,05$

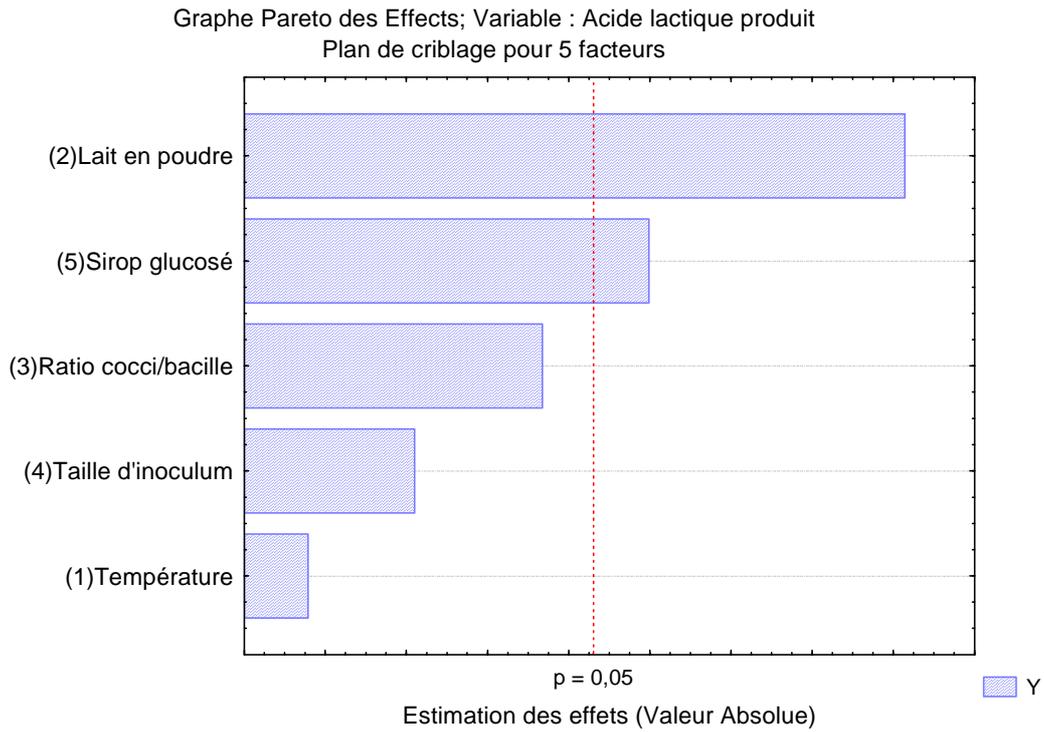
D’après les résultats obtenus pour la première réponse qui est l’acide lactique produit, les facteurs qui ont une influence statistiquement significative sont la quantité de lait en poudre et de sirop de glucose ajoutée. Alors que pour la deuxième réponse qui est l’aspect du yaourt, les facteurs dont l’influence est statistiquement significative sont la température d’incubation ainsi que la quantité de lait en poudre ajouté.

Le coefficient de corrélation linéaire multiple quantifié pour les deux réponses témoigne de la bonne qualité et de la robustesse du modèle ( $R^2 = 0.96$  pour l’aspect et  $R^2 = 0.98$  pour l’acidité) comme nous l’avons déjà mentionné quand la valeur de  $R^2$  s’approche de 1 le modèle est de bonne qualité.

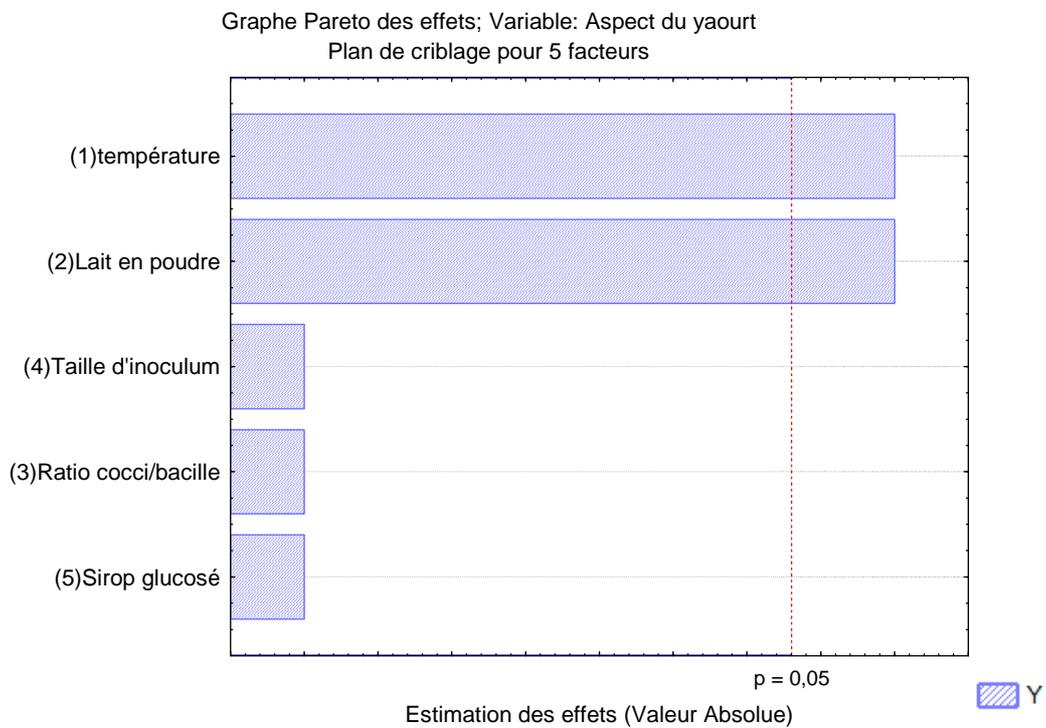
#### 3.4.4. Analyse graphique des résultats

Les diagrammes des coefficients associés à chacune des variables des modèles relatifs aux deux réponses, l’acide lactique produit et l’aspect du yaourt, ainsi que les limites définies pour un niveau de signification  $p = 0,05$  (en pointillés) ont été générés à l’aide du logiciel Statistica<sup>®</sup> 7 et ils sont représentés dans la **figure 13** et **14**.

Les colonnes dépassant le trait en pointillé représentant la limite  $p = 0,05$  sont considérés comme étant statistiquement significatives.



**Figure 12.** Estimation des effets relatifs à la concentration d'acide lactique produit selon le plan de criblage.



**Figure 13.** Estimation des effets relatifs à l'aspect du yaourt produit selon le plan de criblage.

Parmi les 5 facteurs potentiellement influents identifiés lors de la synthèse bibliographique nous avons donc identifié 3 facteurs présentant une influence statistiquement significative sur la concentration de l'acide lactique produit et sur l'aspect du yaourt fini. Ces résultats ne veulent pas dire que les deux autres facteurs (la taille d'inoculum et le ratio cocci/bacille) n'ont pas une influence sur la fabrication du yaourt, tout au contraire, Torriani *et al.*(1996) ont montré par l'utilisation des surface de réponses que le rapport cocci/bacille joue un rôle primordial dans la diminution du pH lors de la fabrication du yaourt, l'augmentation du rapport se traduisait par la baisse du pH et vice-versa. Pour la taille d'inoculum ce même auteur n'a pas trouvé de signification statistique de ce paramètre sur l'acidité, par contre il influe sur la croissance bactérienne.

La modélisation par application de la méthode des plans d'expériences pour l'étude de surface de réponse utilisera les 3 facteurs influents, à savoir la température d'incubation, la quantité de lait en poudre et de sirop glucosé ajouté comme variable et les deux autres facteurs seront fixés à 2% pour la taille d'inoculum et 1:1 pour le ratio cocci/bacille, suivant les résultats rapportés par d'autres auteurs (Beal et Corrieu, 1991; Berkman *et al.*, 1990; Prevost et Divies, 1988).

### **3.5. Application de la méthode de surface de réponse**

L'application des techniques de criblage effectuée précédemment a permis d'identifier les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur la concentration d'acide lactique produit et l'aspect du yaourt. Cette limitation du nombre de facteurs à considérer a pour conséquence directe la réduction du nombre de coefficients à déterminer dans les modèles et de ce fait le nombre d'expériences à réaliser.

Nous allons pour cela reprendre les différentes étapes de la méthode des plans d'expériences pour l'étude de surface de réponse déjà présentées et les mettre en pratique dans le cas de notre application.

#### **3.5.1. Analyse globale des résultats**

Chacun des essais a été réalisé 3 fois. La répétition des mesures a permis de s'assurer de ne pas être en présence d'une valeur extrême lors de l'expérimentation. En présence d'une valeur suspecte, l'essai est réalisé de nouveau et la valeur suspecte est écartée. Les résultats des 17 essais de la matrice d'expériences sont présentés dans le tableau 11, ce sont les valeurs moyennes des 3 essais réalisés :

**Tableau 11.** Plan expérimental composite centré et résultats d'essais à 17 essais.

Essai n°	Température (°C)	Lait en poudre (% m/v)	Sirop Glucosé (% v/v)	Concentration d'acide lactique (g/l)	Aspect de yaourt (x/10)
1	35	2	3	5,1	6
2	45	2	3	6,5	10
3	35	8	3	5,9	6
4	45	8	3	7,4	10
5	35	2	10	3,8	6
6	45	2	10	6,2	8
7	35	8	10	5,6	6
8	45	8	10	7,4	10
9	31.6	5	6,5	5,2	4
10	48.5	5	6,5	6,9	10
11	40	0.04	6,5	5	8
12	40	10.04	6,5	7,4	10
13	40	5	0.62	6,7	10
14	40	5	12.38	5,9	8
15	40	5	6,5	6,3	10
16	40	5	6,5	6,4	10
17	40	5	6,5	6,5	10

D'après ces résultats on peut remarquer à priori que les réponses obtenues du 8<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> essai sont intéressantes, donc on peut prétendre qu'il y a une possibilité que l'optimum soit obtenu à des valeurs proches de ces combinaisons des facteurs de ces essais.

### 3.5.2. Analyse mathématique et statistique des résultats d'essais

L'analyse mathématique consiste essentiellement à identifier les  $\beta$  (coefficients des modèles) à partir des résultats des expériences réalisées, en plus des réponses estimées ou prédites, ces résultats ont été générés grâce au logiciel Statistica® 7 par calcul matriciel (Tableaux 12 et 13).

**Tableau 12.** Estimation des coefficients du modèle relatif à l'acide lactique produit.

Concentration acide lactique g/l ( $Y_{exp}$ )	Concentration acide lactique g/l ( $Y_{est}$ )	Coefficients du modèle ( $\beta_i$ )	Valeurs $p$
5,1	5,19		
6,5	6,45		
5,9	6,27	$\beta_0 : 6,412147$	<b>0,000000 *</b>
7,4	7,28	$\beta_1 : 1,459311$	<b>0,000067 *</b>
3,8	4,07	$\beta_{11} : -0,329321$	0,129235
6,2	5,97	$\beta_2 : 1,279902$	<b>0,000154 *</b>
5,6	5,79	$\beta_{22} : -0,223029$	0,282398
7,4	7,45	$\beta_3 : -0,475492$	<b>0,029130 *</b>
5,2	4,72	$\beta_{33} : -0,152167$	0,453018
6,9	7,17	$\beta_{12} : -0,125000$	0,599081
5	5,02	$\beta_{13} : 0,325000$	0,195420
7,4	7,17	$\beta_{23} : 0,325000$	0,195420
6,7	6,60		
5,9	5,80		
6,3	6,41	<b><math>R^2 = 0,95</math></b>	
6,4	6,41		
6,5	6,41		

Le signe (\*) représente le caractère significative des facteurs avec  $p < 0.05$

**Tableau 13.** Estimation des coefficients du modèle relatif à l'aspect du yaourt.

Aspect du yaourt $Y_{exp}$	Aspect du yaourt $Y_{est}$	Coefficients du modèle ( $\beta_i$ )	Valeurs $p$
6	6		
10	10		
6	6	$\beta_0 = 10,03190$	<b>0,000000 *</b>
10	10	$\beta_1 = 3,52955$	<b>0,000006 *</b>
6	6	$\beta_{11} = -2,33936$	<b>0,000163 *</b>
8	8	$\beta_2 = 0,78565$	<b>0,030609 *</b>
6	6	$\beta_{22} = -0,92213$	<b>0,023744 *</b>
10	10	$\beta_3 = -0,78565$	<b>0,030609 *</b>
4	4	$\beta_{33} = -0,92213$	<b>0,023744 *</b>
10	10	$\beta_{12} = 0,50000$	0,229611
8	8	$\beta_{13} = -0,50000$	0,229611
10	9	$\beta_{23} = 0,50000$	0,229611
10	9		
8	8		
10	10	<b><math>R^2 = 0,97</math></b>	
10	10		
10	10		
10	10		

Le signe (\*) représente le caractère significative des facteurs avec  $p < 0.05$

Les résultats obtenus représentés dans le tableau 12 montrent que les 3 facteurs (la température d'incubation, le lait en poudre et le sirop glucosé) étudiés ont une influence significative par leur terme linéaire sur la production d'acide lactique, avec une influence positive de la température et du lait en poudre ajouté, contrairement au sirop de glucose qui a une influence négative sur la concentration d'acide lactique produit.

Alors que, les résultats obtenus représentés dans le tableau 13 montrent quand à eux une influence des termes linéaire et quadratique des 3 facteurs sur l'aspect du yaourt, avec un effet linéaire positif de la température et du lait en poudre et négatif pour le sirop glucosé ajouté et un effet quadratique négatif pour les trois facteurs sur l'aspect du yaourt. Le coefficient positif du facteur individuel et le coefficient négatif du terme quadratique indique qu'il est possible d'identifier un niveau optimal des trois facteurs pour l'aspect du yaourt. On note aussi que les effets des interactions entre les facteurs sur les réponses étudiées ne sont pas statistiquement significatifs.

Les coefficients du modèle permettent d'écrire l'équation qui relie la réponse aux 3 facteurs étudiés donnant la valeur maximale des réponses choisies, nous facilitant ainsi le calcul de toutes les réponses du domaine d'étude sans être obligés de faire les expériences.

L'équation s'écrit comme suit :

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

#### Pour la production d'acide lactique

$$y = 6,41 + 1,46 x_1 + 1,28 x_2 - 0,47 x_3 - 0,33 x_1^2 - 0,22 x_2^2 - 0,15 x_3^2 - 0,12 x_1 x_2 + 0,32 x_1 x_3 + 0,32 x_2 x_3$$

Mais si on prend en considération juste les facteurs qui ont une influence statistiquement significative l'équation s'écrit comme suit :

$$y = 6,41 + 1,46 x_1 + 1,28 x_2 - 0,47 x_3$$

#### Pour l'aspect du yaourt

$$y = 10,03 + 3,53 x_1 + 0,78 x_2 - 0,78 x_3 - 2,34 x_1^2 - 0,92 x_2^2 - 0,92 x_3^2 + 0,50 x_1 x_2 - 0,50 x_1 x_3 + 0,50 x_2 x_3$$

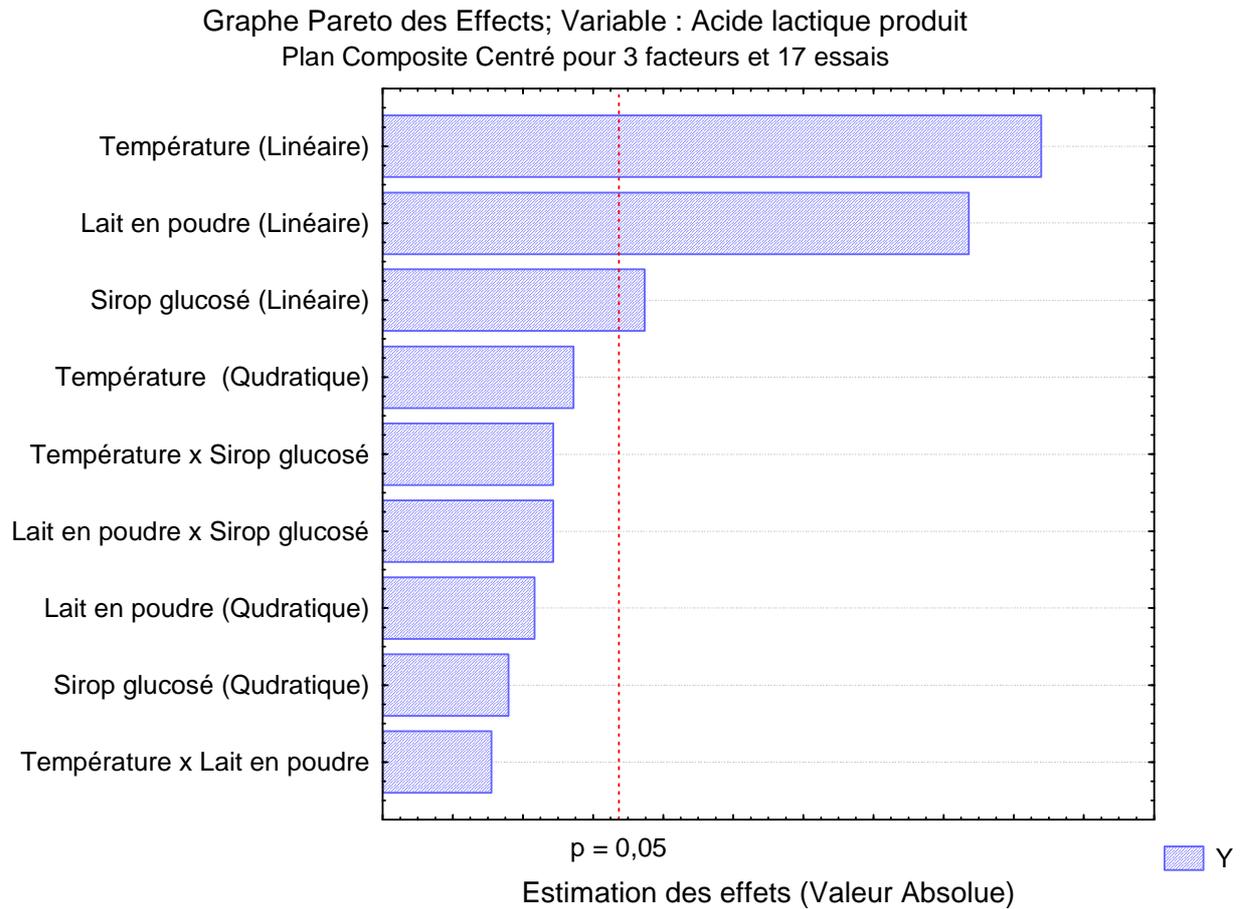
Mais si on prend en considération juste les facteurs qui ont une influence statistiquement significative l'équation s'écrit comme suit :

$$y = 10,03 + 3,53 x_1 + 0,78 x_2 - 0,78 x_3 - 2,34 x_1^2 - 0,92 x_2^2 - 0,92 x_3^2$$

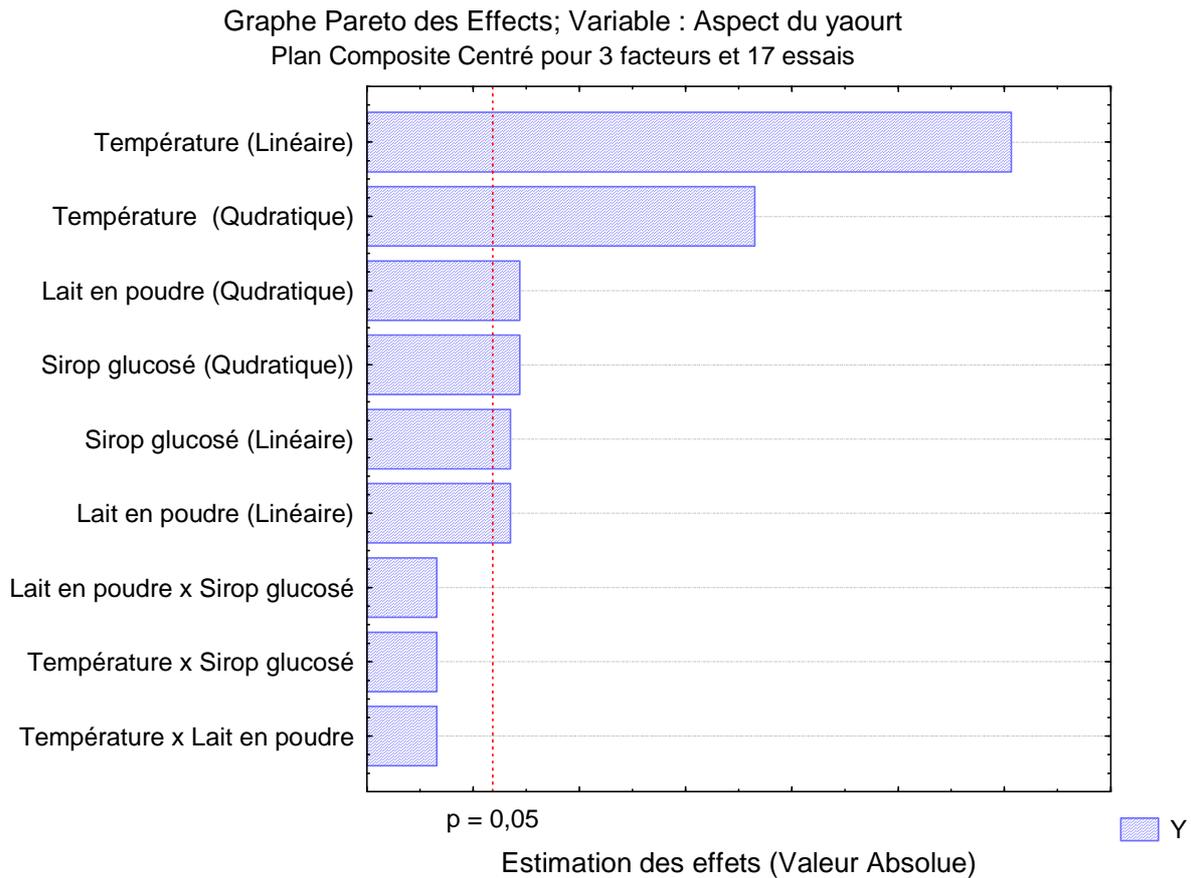
A partir de cette équation du second degré on peut extraire par la méthode des dérivées la valeur de  $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$  pour une réponse maximale.

**3.5.3. Analyse graphique des résultats (graphe d'estimation des effets)**

Dans les figures 15 et 16 nous avons représenté en forme de diagramme les résultats mathématiques et statistiques obtenus, à savoir les coefficients des deux modèles relatifs aux deux réponses étudiées, les colonnes dépassant le trait en pointillé représentant la limite  $p=0,05$  sont considérés comme étant statistiquement significatives.



**Figure 14.** Représentation graphique des effets relatifs à la concentration d'acide lactique produit selon le plan composite centré.



**Figure 15.** Représentation graphique des effets relatifs à l’aspect du yaourt produit selon le plan composite centré.

### 3.5.4. Analyse graphique des résultats par l’utilisation des surfaces de réponses

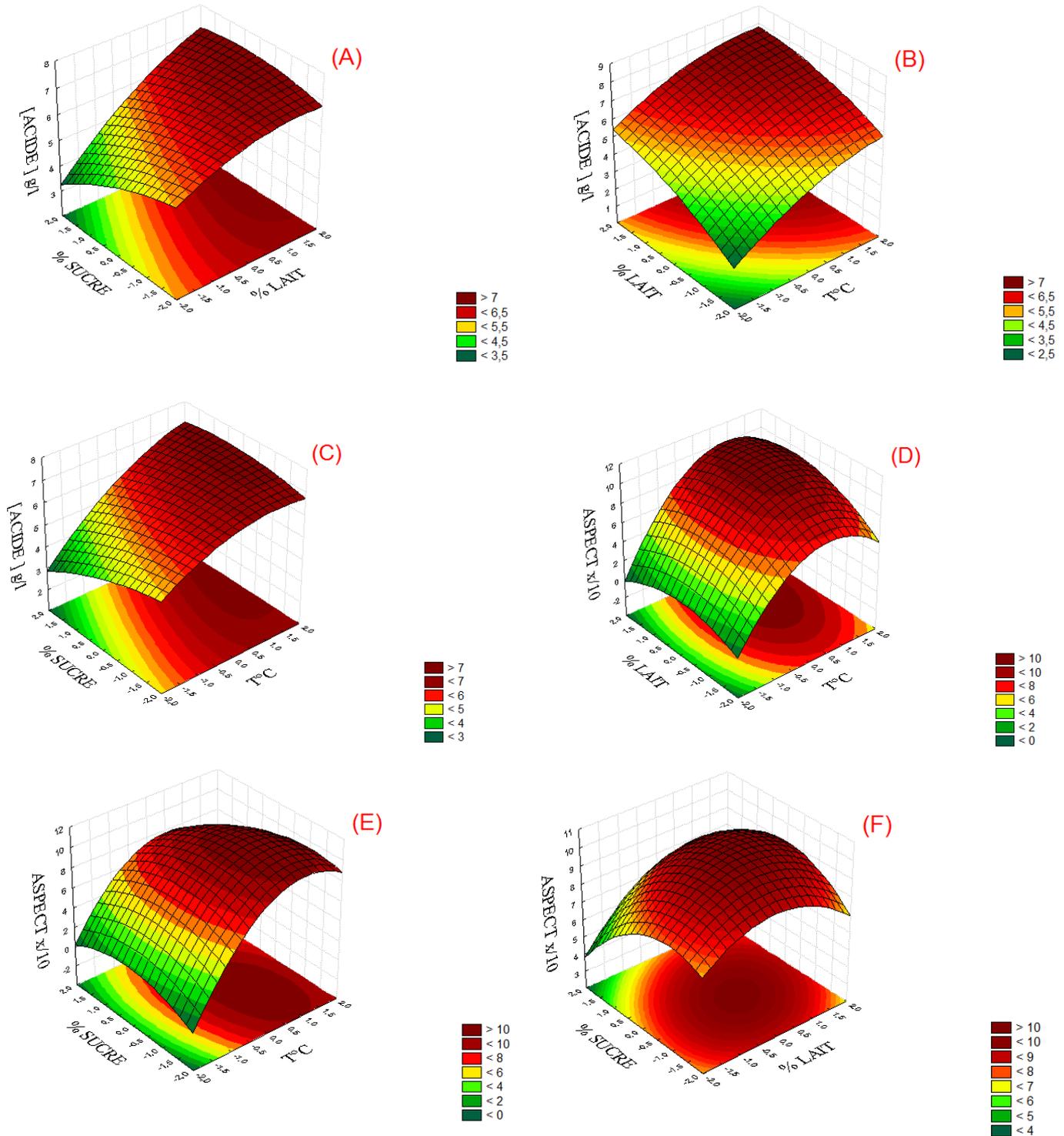
Les surfaces de réponses peuvent présenter les variations des réponses en fonction de seulement 2 facteurs à la fois, les autres facteurs étant réglés sur une valeur fixe. La figure 15 représente les surfaces de réponses associées aux modèles de production d’acide lactique et de l’aspect du yaourt.

La figure (15A) représente la variation de la concentration de l’acide lactique en fonction des deux facteurs T°C et sirop glucosé ajouté. D’après ce graphe on déduit d’une part l’effet linéaire positif de la T°C et d’autre part l’effet négatif du sirop de glucose ajouté.

Pour la figure (15B) représentant la variation de la production d’acide lactique en fonction de la température et du lait en poudre rajouté, on note un effet positif des deux facteurs sur la réponse.

Les figures (15D, E, F) montrent le même effet pour la concentration d’acide lactique produit, mais à l’effet linéaire des ces facteurs, s’ajoutent l’effet quadratique qui est représenté par la courbure de la surface de réponse alors que pour une forme plane l’effet est juste linéaire.

Ceci confirme les résultats mathématiques obtenus préalablement pour l’influence des effets linéaires et quadratiques des facteurs température et poudre de lait ajouté par exemple, et vient de le confirmer ici graphiquement.



**Figure 16.** Représentations tridimensionnelles des effets des facteurs sur l'acide lactique produit et l'aspect du yaourt :

(A) effet du lait en poudre et sirop glucosé ajouté sur la concentration d'acide lactique produite. (B) effet du lait en poudre ajouté et température d'incubation sur la concentration d'acide lactique produite. (C) effet du sirop glucosé ajouté et de la température d'incubation sur la concentration d'acide lactique produite. (D) effet du lait en poudre ajouté et de la température d'incubation sur l'aspect du yaourt. (E) effet du sirop glucosé ajouté et de la température d'incubation sur l'aspect du yaourt. (F) effet du lait en poudre et sirop glucosé ajouté sur l'aspect du yaourt.

Les variables considérées dans cette étude sont reconnues pour être parmi les plus importantes pour déterminer la qualité et les caractéristiques organoleptiques des yaourts. En outre les domaines choisis pour chaque variable correspondent à ceux utilisés généralement dans le but de produire différents types de yaourt pour satisfaire la demande des consommateurs. L'utilisation d'un plan composite centré est une méthode valable pour analyser les effets individuels et combinés des variables sélectionnées et d'optimiser les caractéristiques technologiques et de production de yaourt afin d'obtenir un produit final avec les caractères désirés, comme cela a été démontré pour d'autres produits alimentaires (Abdullah *et al.*, 1994).

En général, dans l'industrie du yaourt le lait est fermenté à une température entre 40-45°C, c'est l'optimal pour les deux souches et pour une courte durée d'incubation l'inoculation se fait à 3% avec un ratio équilibré. Une plus longue durée d'incubation peut être effectuée à 30-35°C pendant 16 à 18h ou jusqu'à l'obtention du pH désiré (Hrabova et Hylmar, 1987). On peut donc dire que la température agit surtout sur la durée d'incubation. Si nous avons laissé nos yaourts fermenter pendant une plus longue durée pour ceux incubés aux températures de moins de 40°C, nous aurions eu le même résultat pour tous les laits fermentés avec des durées d'incubation différentes. Cho-Ay-Ying *et al.*, (1990) ont produit du yaourt à 38 et 43°C et ont conclu que la température d'incubation a significativement affecté un seul caractère sensoriel qui est la texture, c'est ce que nous avons remarqué lors de notre expérimentation.

Le lait en poudre suivant nos résultats agit positivement sur la production d'acide lactique ainsi que sur l'aspect du yaourt, en effet selon Boubchir-Ladj (2011) la valeur de la viscosité initiale tend à augmenter avec le taux d'enrichissement en poudre de lait, la fortification avec 5% en poudre de lait améliore les propriétés rhéologiques du yaourt (Fox, 2001; Tamime *et al.*, 2001).

Boubchir-Ladj (2011) a aussi relevé une augmentation de l'acidité engendrée par l'augmentation du taux d'enrichissement en poudre de lait. Ces variations selon elle sont imputables au développement des bactéries lactiques (favorisé par la disponibilité des nutriments) qui acidifient le milieu par la production d'acide lactique.

Selon Prentice (1992) l'augmentation du taux de protéines est le facteur principal influençant la texture et l'enrichissement du lait. Le lait en poudre agit sur le développement des chaînes et des agrégats des micelles de caséine. La microstructure du lait est fonction de la concentration en matière sèche (Schkoda *et al.*, 1998 ; Van Marle, 1998 ; Tamime *et al.*, 1999).

Le saccharose quand à lui a un effet négatif sur la production d'acide lactique et sur l'aspect du yaourt, nous supposons que c'est sûrement dû à la diminution de l'activité de l'eau, ce qui va affecter l'activité métabolique des bactéries et la production d'acide lactique qui va agir sur la texture du yaourt. En effet Richardson *et al.*, (1987) ont constaté par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) une diminution de la mobilité de l'eau avec augmentation de la concentration en saccharose. Un effet inhibiteur de la croissance des bactéries du yaourt a souvent été signalé en présence d'une haute teneur en saccharose dans le lait (10-12%). Elle est due à la fois à un effet négatif osmotique des solutés dans le lait et à une faible activité de l'eau (Tamime et Robinson, 1985).

### 3.6. Analyse statistique des deux modèles

Cette première étape de l'analyse statistique permet de calculer la probabilité  $P$  de refuser à tort l'hypothèse nulle  $H_0$ . Nous obtenons pour nos deux réponses (Tableaux 14 et 15) une valeur très faible de  $P$  ce qui conforte l'hypothèse de l'utilisation des modèles quadratiques pour modéliser les réponses avec  $F\text{-test} > F\text{-critique}$ .

**Tableau 14.** Tableau d'analyse de régression relatif au model de la production d'acide lactique.

Somme des carrés		ddl		Carré moyen		F-test		F critique	Signification
SCE	14,4335276	$p-1$	9	$CME=SCE/(p-1)$	1,603725284	CME/CMR	13,3316673	4,1	***
SCR	0,72176657	$n-p-1$	6	$CMR=SCR/(n-p-1)$	0,120294428			0,002452839	
SCT	15,1552941	$n-1$	16					$P$	

Le signe (\*\*\*) représente le caractère très significative avec  $p < 0.05$  permettant ainsi de rejeter l'hypothèse  $H_0$

**Tableau 15.** Tableau d'analyse de régression relatif au model de l'aspect du yaourt

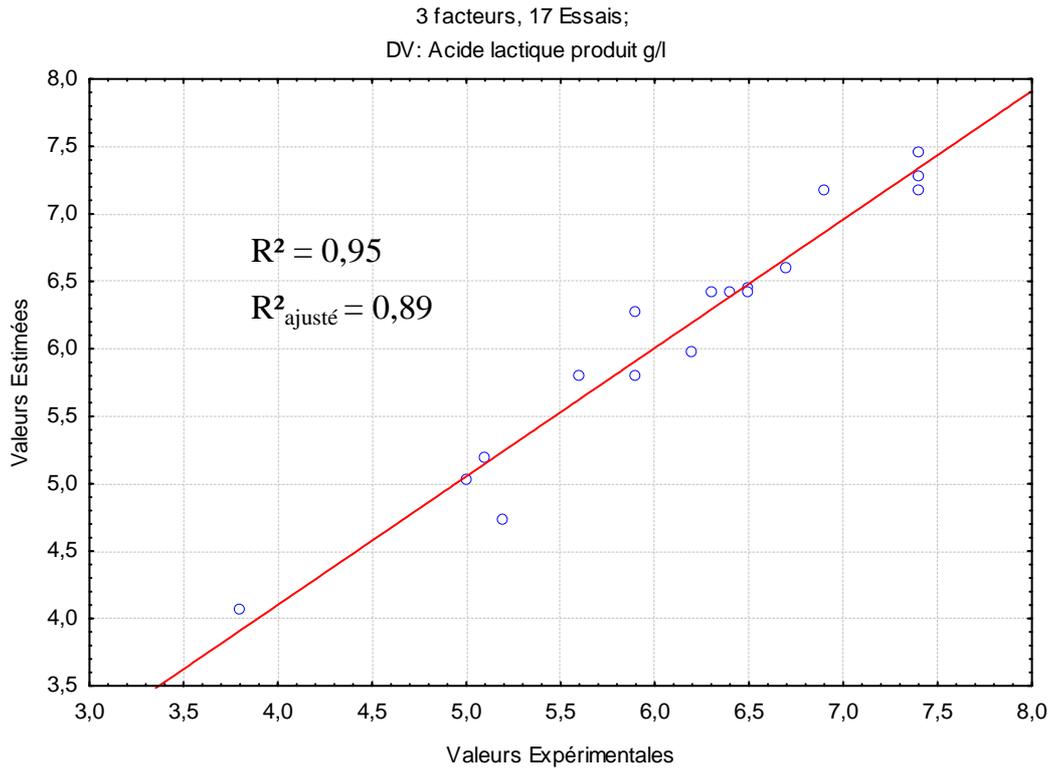
Somme des carrés		ddl		Carré moyen		F-test		F critique	Signification
SCE	63,8615899	$p-1$	9	$CME=SCE/(p-1)$	7,095732207	CME/CMR	21,0684735	4,1	***
SCR	2,02076307	$n-p-1$	6	$CMR=SCR/(n-p-1)$	0,336793846			0,000683374	
SCT	65,8823529	$n-1$	16					$P$	

Le signe (\*\*\*) représente le caractère très significative avec  $p < 0.05$  permettant ainsi de rejeter l'hypothèse  $H_0$

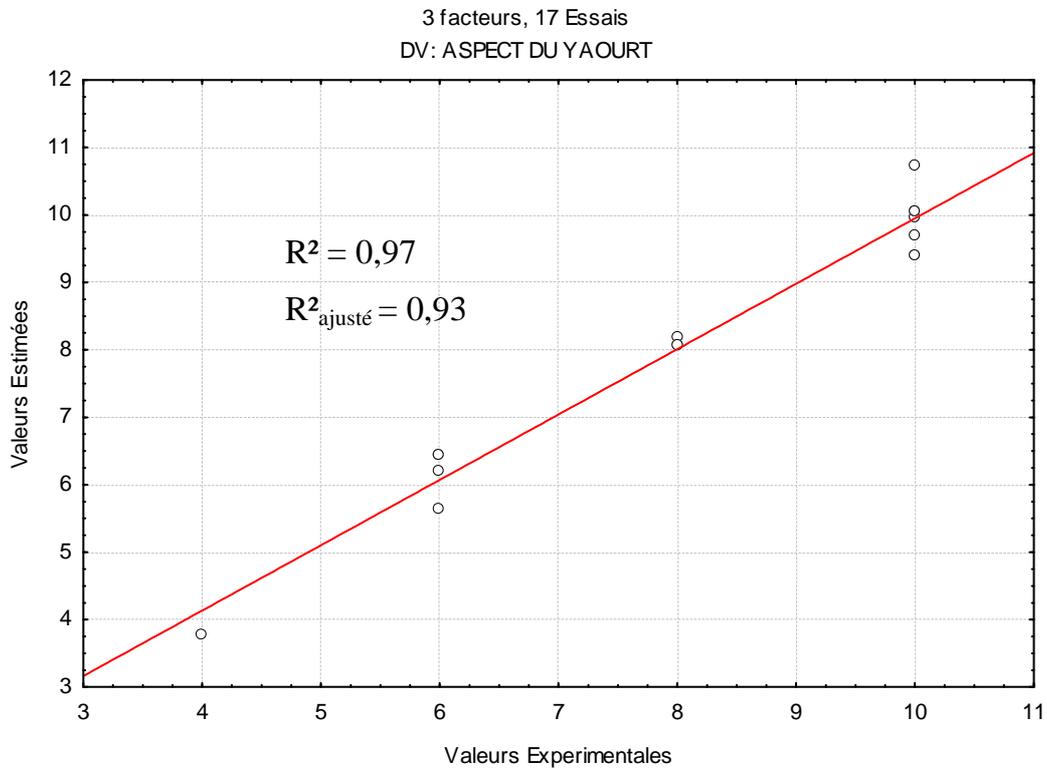
### 3.7. Analyse graphique des deux modèles

Afin de juger de la robustesse de notre modèle nous avons comparé les résultats expérimentaux aux résultats prédits par le logiciel, cette comparaison a été faite à l'aide de la courbe de régression linéaire, il s'agit en quelque sorte de la droite qui représente l'évolution des « réponses d'équilibre ». Plus les valeurs expérimentales seront proches de la droite de régression linéaire, plus le modèle sera pertinent et le  $R^2$  sera élevé.

Sur ces deux graphes nous notons que l'alignement des nuages de points est très proche de la droite (représentée en trait plein), ce qui témoigne de la robustesse du modèle, avec un  $R^2=0,95$  pour le modèle de production d'acide lactique et  $R^2=0,98$  pour le modèle de l'aspect du yaourt.



**Figure 17.** Courbe de régression linéaire relative au modèle de la production d'acide lactique.



**Figure 18.** Courbe de régression linéaire relative au modèle de l'aspect du yaourt.

### 3.8. Recherche des conditions optimales

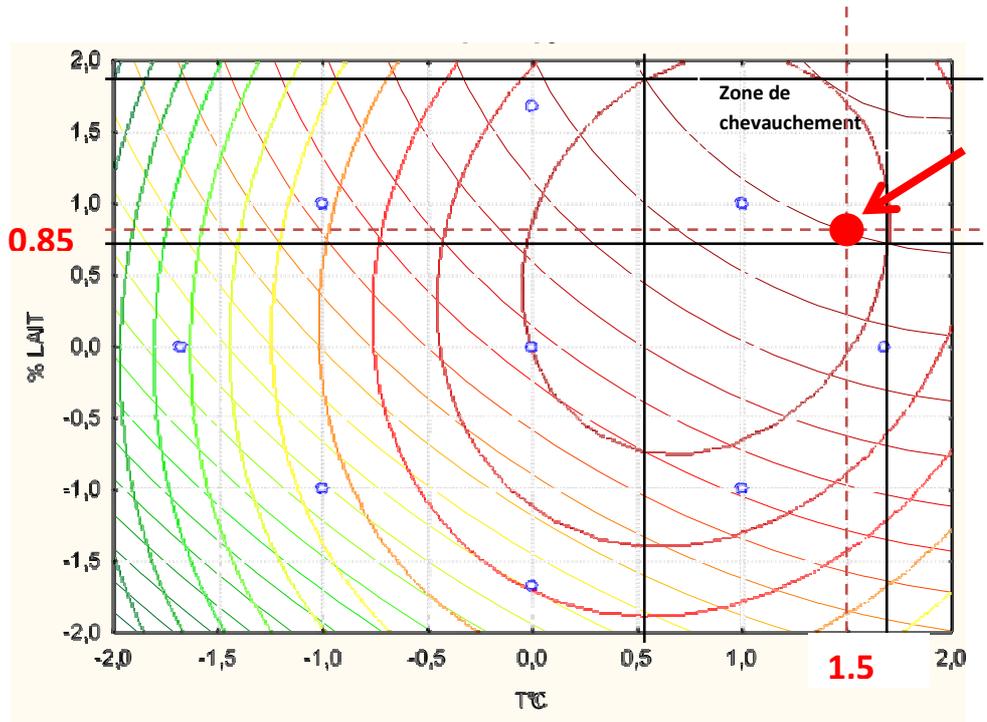
Ces deux modèles permettent de tracer les courbes iso-réponses pour les deux réponses étudiées sur un même graphique (Figures 19 et 20), en les superposant afin de délimiter les zones d'intérêts c'est-à-dire la zone où les deux exigences sont respectées. Si on choisit de se mettre au milieu de cette zone on trouve un résultat répondant parfaitement aux objectifs de l'étude, c'est-à-dire que l'optimum sera atteint.

La figure 19 représente la superposition des courbes iso-réponse pour les deux facteurs température d'incubation et la quantité de lait en poudre ajouté, la zone de chevauchement est délimitée par l'intervalle en valeur codée [0,55 à 1,70] pour la température et [0,70 à 1,88] pour la quantité de lait en poudre ajoutée et en valeur décodée par l'intervalle [42,75 à 48,5] et [7,1 à 10,64] pour les deux facteurs respectivement.

La superposition des deux courbes iso-réponse pour les deux facteurs température et quantité de sirop glucosé ajouté (figure 20) nous a permis de délimiter la zone de chevauchement relative à la zone des valeurs optimales. Les intervalles en valeur codée pour les deux facteurs sont respectivement [0,52 à 1,60] et [-1,23 à 0,5], et en valeur décodée [42,6 à 48] et [2,2 à 8,25].

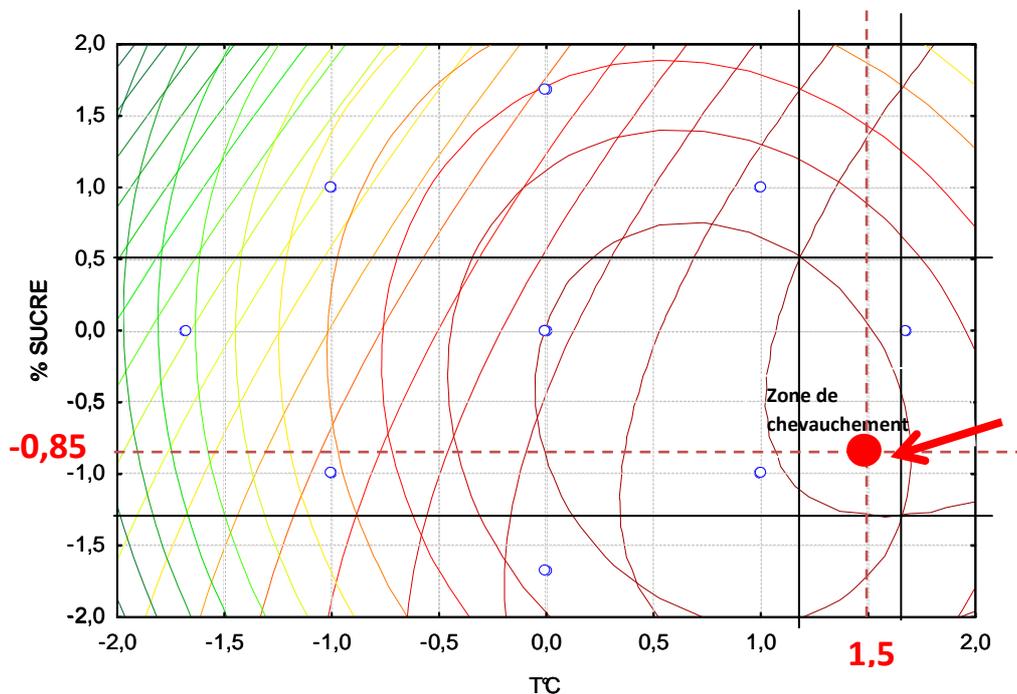
Si on dérive l'équation du modèle relative à l'aspect du yaourt pour chaque facteur nous obtenons  $x_1 = 1,50$ ,  $x_2 = 0,85$ , et  $x_3 = -0,85$  en valeurs codées et  $x_1 = 47,5^\circ\text{C}$ ,  $x_2 = 7,55\%$  et  $x_3 = 3,52\%$ . Avec  $x_1$  la température d'incubation,  $x_2$  la quantité de lait en poudre ajoutée et  $x_3$  la quantité de sirop glucosé ajouté.

Les valeurs issues de l'équation mathématique font partie de l'intervalle issu de l'analyse graphique de la superposition des courbes iso-réponse.



- Le point de la réponse optimale issu de l'analyse mathématique.
- Les valeurs issues de l'équation mathématique.
- Délimitation de la zone de chevauchement.

**Figure 19.** Superposition des courbes d'iso-réponse relatif à la production d'acide lactique et à l'aspect du yaourt en fonction des deux facteurs température d'incubation et la quantité de lait en poudre ajouté.



- Le point de la réponse optimale issu de l'analyse mathématique.
- Les valeurs issues de l'équation mathématique.
- Délimitation de la zone de chevauchement.

**Figure 20.** Superposition des courbes d'iso-réponse relatif à la production d'acide lactique et à l'aspect du yaourt en fonction des deux facteurs température d'incubation et la quantité de sirop glucosé ajouté.

## Conclusion.

La fermentation résulte principalement de l'action de différents micro-organismes qui participent à la transformation du lait en yaourt. L'évolution et l'activité de cette flore est très influencées par les conditions de fermentation (température, composition du lait). L'objectif principal de cette étude visait à développer des modèles mathématiques capables de relier l'acidification et l'aspect du yaourt aux paramètres influant le procédé de fabrication.

La première étape du travail a consisté à établir une base de données expérimentale indispensable pour l'établissement et la validation des modèles mathématiques. Cette base comporte les résultats des analyses chimiques et descriptives réalisées sur des échantillons de yaourt, ainsi que les valeurs des conditions opératoires de fermentation. Les yaourts ont étéensemencés par un mélange composé de lactobacilles et coques lactiques. La fermentation de ces yaourts a été limitée à 10 heures d'incubation et elle a été conduite selon deux plans d'expériences :

- le premier dit de criblage à cinq facteurs (la température d'incubation, la taille d'inoculum, le ratio cocci/bacille, le lait en poudre et le sirop glucosé ajouté) et à deux niveaux (minimum, maximum), afin d'identifier les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur le procédé, le but de cette phase d'identification a été de limiter le nombre de facteurs en vue d'une étude de surface de réponse.
- Le deuxième plan est le plan composite centré à trois facteurs (la température d'incubation, le lait en poudre et le sirop glucosé ajouté) issus du premier plan et à cinq niveaux ( $-\alpha$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $+1$ ,  $+\alpha$ ), le but de cette étape a été l'optimisation du procédé, afin de trouver les valeurs optimales pour chaque facteur mathématiquement et graphiquement.

La deuxième étape constitue une approche empirique qui a été adoptée pour construire les modèles mathématiques. Deux modèles mathématiques ont été développés, le premier modèle décrit l'évolution de la concentration d'acide lactique produit en fonction des paramètres de la fermentation du yaourt, le deuxième modèle décrit le changement de l'aspect du yaourt en fonction des conditions de fabrication de ce dernier.

Les deux modèles nous ont permis d'exprimer en fonction des facteurs ayant une influence significative sur le procédé la concentration d'acide lactique produite et l'aspect du yaourt. L'analyse statistique des modèles témoigne de leur robustesse avec un coefficient de régression proche de 1 pour les deux modèles. De plus les résultats issus des essais ayant servi à l'ajustement des paramètres sont similaires à ceux calculés par le modèle : ceci a été démontré par la courbe de régression linéaire. Ceci montre que le modèle est capable dans les limites du plan d'expérience de donner des prédictions dans d'autres combinaisons de facteurs.

En perspective il serait intéressant de valider les résultats obtenus d'un point de vue expérimental et il serait judicieux d'examiner comment prendre en considération lors de futurs travaux de modélisation la contribution des différentes activités technologiques telles que la protéolyse et l'activité aromatique dans l'élaboration des propriétés organoleptiques du yaourt. Ceci présente une difficulté non négligeable mais pourrait faire l'objet d'une évaluation globale dont l'intérêt est évident.

## **Références bibliographiques**

- Abdullah B., Gardini F., Paparella A. & Guerzoni M. E. (1994).** Growth modelling of the predominant microbial groups in hamburgers in relation to the modulation of atmosphere composition, storage temperature, and diameter of meat particle. *Meat Science*, **38**, 511-526.
- Abou-Donia S.A. (1986).** Egyptin fresh fermented milk (review), New Zealand. *Journal of Dairy Science and Technology*. **19**, 7-15.
- Accolas J.P., Blooquel R., Didiene R. & Regmier J. (1982).** Acidifying, properties of thermophilic lactic bacteria in relation to yogurt productions. *Industria lechera*, **62**, 14-16.
- Accolas J.P., Veaux M. & Auclair J. (1971).** Étude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*, **51**, 249-272.
- Amoroso M.J., Nanca de Nandra M.C. (1990).** Microbiologie, Aliments, Nutrition, p. 105
- Amrane A. (2001).** Lactic acid production during the associated and the deceleration growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated in various conditions and media. Physiology, metabolism. *Lait*, **81**, 91-103.
- Angelov M., Kostov G., Simova E., Beshkova D. & Koprinkova-Hristova. (2009).** Oxygen influence in the mutual metabolism of *St. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* in yogurt starter cultures, <http://www.revue-genie-industriel.info/> (in press).
- Anonyme. (1995).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : *Alimentation et nutrition*. 28.
- Bautista E.S., Dahiya R.S. & Speck M.L. (1966).** Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk, *Journal of Dairy Research*, **33**, 299–307.
- Beal C. & Corrieu G. (1991).** Influence of pH, temperature, and inoculum composition on mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 90-98.
- Béal C. & Sodini I. (2003).** Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire, Doc. F6 315.

- Bergamaier D. (2002).** Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de doctorat, Université de Laval, Canada.
- Berkman T., Bozuglu T. F. & Ozilgen M. (1990).** Mixed culture growth kinetics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Enzyme Microbiology Technology*, **12**, 138-140.
- Bernard O. (2004).** La modélisation des systèmes biologiques : Allers-retours le long des fleuves qui circulent entre l'océan du réel et le lac des modèles. Thèse Pour l'obtention de l'habilitation à diriger des recherches. Université de Nice-Sophia-Antipolis.
- Bottazzi V. & Battistotti B. (1972).** Montescani. Influence des souches seules et associées de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* dans le yaourt. *Le Lait*, **52**, 295-305.
- Boubchir-Ladj K. (2011).** Effets de l'enrichissement (avec des concentrés de protéines laitières) et des paramètres technologiques sur la qualité du yaourt fabriqué à laiterie Soummam d'Akbou. Thèse présentée pour l'obtention du diplôme de Magister de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou Algérie.
- Boudier J. F. (1990).** Produits frais. In laits et produits laitiers : Vache - Brebis - Chèvre. pp. 35-66. ed. Luquet, F.M., Technique et Documentation, Lavoisier, Paris.
- Boutrou R., Sepulchre A., Gripon J.C. & Monnet V. (1998).** Simple tests for predicting the lytic behaviour and proteolytic activity of lactococcal strains in cheese. *Journal of Dairy Science*. **81**, 2321-2328.
- Box G.E.P. & Hunter J.S. (1962).** The 2k-p fractional factorial plans. *Technometrics*, **4**.
- Box G.E.P., Hunter W.G. & Hunter J.S. (2005).** Statistics for Experimenters. John Wiley and Sons (Ed.). New-York.
- Cerning J., Buillanne C. & Landon M. (1990).** Comparaison of exocellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Science des aliments*, **10**, 443-451.
- Cho-Ah-Ying F., Duitschaever C. L. & Buteau C. (1990).** Influence of temperature of incubation on the physico-chemical and sensory quality of yoghurt. *Cultured Dairy Products Journal*. **8**, 11-14.
- Chomakov H. (1987).** Bulgarian yogurt—health and long living, Zemizdat'(Ed.), Sofia, (in Bulgarian).
- Codex of Fermented milk. (2003).**
- Courtin P., Monne M. & Rul F. (2002).** Cell-wall proteinases PrtS and Prt B have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, **148**, 3413-3421.

- Davis J.G.(1971)**, Enumeration and viability of *L.bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts, *Dairy Industry*. **36**, 569-573
- De Man J., Rogosa M. & Sharpe M.E. (1960)**. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**,130-135.
- Dellaglio F., De Rossart H., Torrianis S., Curik M. & Janssens D. (1994)**. Caractérisation générale des bactéries lactiques. *Techniques et Documentation*. Lorica (Ed.), **1**, 25-116.
- Desmazeaud M. (1983)**. L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*, **63**, 267-316.
- Doehlert D.H. (1970)**. Uniform shell designs. *Journal of the Royal Statistical Society*, **19**.
- Doleyres Y. (2003)**. Production en continue du ferment lactique probiotique par la technologie des cellules immobilisées. Thèse de Doctorat. Université de Laval, Quebec.
- Driessen F.M. (1981)**. Protocooperation of yogurt bacteria in continuous culture In: *Mixed Cultures Fermentation*. M.E. Buchell, J.H.Slater (Eds.). Academic Press. New York. pp. 99-120.
- Driessen F.M. & Kingma F. (1982)**. Standhouders J. Evidence that Lactobacillus bulgaricus in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by Streptococcus thermophilus, *Netherland Milk Dairy Journal* , **36**, 135-144.
- Driessen F.M. & Kingma F. (1982)**. Standhouders J. Hol yougurt bacterien alkaar helpen grocien, *Zuivelicht* , **74**, 176-178
- Droesbeke J.J., Fine J. & Saporta G. (1997)**. Plan d'expériences : Application à l'entreprise. Technip (Ed.).
- Eck A. & Gillis J.C. (1997)**. Le fromage—de la science à l'assurance-qualité. Eck A., Gillis J. (Eds.). Lavoisier. New York.
- Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Wilkstrom C. & Wold S. (2000)**. Design of experiments, Principles and application. Umetrics Academy.
- Ernest J.M. (1990)**. Youghurts, part 1. *Dairy Industries International*, **55**, 40-41.
- FAO. (1975)**. Norme FAO. II
- FAO/OMS. (1974)**. Expert Comite on Food Additives. *Technical Bulletin*, **5**, 461-465.
- Farkye N.Y & Imafidon G.I. (1995)**. Thermal denaturation of indifenous milk enzymes. In Heat-induced changes in milk, 2nd Ed. pp. 331-345. ed. Fox, P.H., International Dairy Federation, Brussels.

- Faucher J. (2006).** Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue. Thèse de l'INPT.
- Fédération internationale de laiterie, FIL. (1984).** Séminaire sur les laits fermentés, Avignon 14-16 mai. *Bulletin International Dairy Federation*, 179.
- Fisher R.A. (1935).** The design of experiments. Oliver and Boyd (Ed.), Edinburgh.
- Flejtas O. & Gruev P. (1977).** Comparative performance of industrial and new isolated strains of *L. bulgaricus* with respect to acid formation properties, *Scientific works of HIFFI*, 24(1) (in Bulgarian).
- Fox P. F. (2001).** Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, 54, 41-55.
- Fredrickson A.G. (1977).** Behavior of mixed cultures of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 31, 63-87.
- Goupy J. (1999).** Plan d'expériences pour surface de réponse. Dunod (Ed.), Paris.
- Goupy J. (2001).** Introduction aux Plans d'expériences. Dunod (Ed.), Paris.
- Higashio K., Yoshioka Y. & Kikuchi T. (1977).** Isolation and identification of growth factor of *Streptococcus thermophilus* by *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 51, 203-208.
- Hrabova H. & Hylmar B. (1987).** Dairy Science Abstracts, 49, 22
- Hubert P. (1996).** Définition du modèle. *Dictionnaire français d'hydrologie*. Comité National Français des Sciences Hydrologiques (Ed.).
- Imhof R., Glättli H. & Bosset J.O. (1994).** Volatile organic aroma compounds produced by thermophilic and mesophilic mixed strain dairy starter cultures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 27, 442-449.
- Juillard V., Desmazeaud M.J. & Spinnler H.E. (1988).** Demonstration of urease activity in *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 818-822.
- Juillard V., Helinck S., Flambard B. & Foucaud C. (1998).** Richard J. Amino acid supply of *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Recent Research Developpement in Microbiology*, 2, 233-252.
- Kalab M., Emmons D.B. & Sargant A.G. (1976).** Milk gel structure V : Microstructure of yoghurt as related to the heating of milk. *Milchwissenschaft*, 31, 402-408.
- Kondratenko M.S., Gruev P. & Mutafova K.P. (1985).** *Bulgarian yogurt*, Zemizda (Eds.), Sofia, (in Bulgarian).

- Koning W. & Otto N. (1983).** Mécanismes de transport des nutriments dans les bactéries lactiques. *In* : Les Bactéries lactiques T1, Aspects fondamentaux et technologiques. pp. 604. ed. Lorica, Lavoisier.
- Kosikowski F.V. (1982).** *Cheese and Fermented Milk Foods*. New York,.
- Kurmann J. A. (1966).** L'épreuve de la réductase au bleu de méthylène, un test d'activité simple pour la préparation et l'analyse des levains de streptocoques lactiques dans la fabrication des fromages. *Le Lait*, 457, p. 395.
- Kurmann J. A. (1966).** L'influence de la température de conservation sur la culture mère du yoghourt. *L'Industrie laitière*, n° 234, 341-453.
- Lamoureux L. (2000).** Exploitation de l'activité  $\beta$ - galactosidase de culture de bifidobactéries en vue d'enrichir des produits laitiers en galacto-oligosaccharides. Mémoire de maîtrise. Université de Laval, Canada.
- Leory F., Degeest B. & De Vuyst L. (2002).** A novel area of predictive modeling : describing the functionality of beneficial micro-organisms in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **73**, 251-259.
- Letort C., Nardi M., Garault P., Monnet V. & Juillard V. (2002).** Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 3162-3165.
- Lim E.M., Lafon A., Dridi L., Boudebouze S., Ehrlich D. & Maguin E. (2001).** Identification de protéines de stress chez *Lactobacillus bulgaricus* par électrophorèse bidimensionnelle. *Lait*, **81**, 317-325.
- Loones A. (1994).** Lait fermentés par les bactéries lactiques. *In* Bactéries lactiques. pp. 37-151. ed. De Roissart, H. et Luquet, F.M., II , Lorica, paris.
- Loones A. (1994).** Lait fermentés par les bactéries lactiques. *In* Bactéries lactiques : Aspects fondamentaux et technologiques. pp. 135-154. ed. De Roissart, H. et Luquet, F.M., II, Lorica, Uriage.
- Louvet F. & Delplanque L. (2006).** Design of experiments : the French touch / Les plans d'expériences : une approche pragmatique et illustrée. Témoignage de l'association Expérimentique.
- Luquet F.M. & Carrieu G. (2005).** Bactéries lactiques et probiotiques. Collection sciences et techniques agroalimentaires. *Techniques et documentation*. Lavoisier (Ed.), Paris. 307.
- Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. & Schuck P. (2000).** Les produits industriels laitiers. *Techniques et documentation*. Lavoisier (Ed.), Paris. 26-40.
- Marshall V.M.E. (1987).** Lactic acid bacteria: starters for flavor, *FEMS Microbiology Review* , **46**, 327.

- Marty-Teyssset C., De La Torre F. & Garel J.R. (2000).** Increased production of hydrogen peroxyde by lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus upon aeration : involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (1), 262-267.
- Matalon M.E. & Sandine W.E. (1986).** Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus and yogurt: a review. *Cult. Dairy Prod. J.* **21**, 6-12.
- Mietton B., Weber F., Desmazeaud M. & De Roissart H. (1994).** Transformation des produits animaux Transformation du lait en fromage. In Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologique. Vol 2. De Roissart, H. & Luquet, F. M. (Eds), Loriga, Uriage, 55-133.
- Mottar J., Bassier A., Joniau M. & Baert J. (1989).** Effet of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science*, **72**, 2247-2256.
- National Research Council. (1990).** Groundwater Models : Scientific and Regulatory Applications. National Academies Press, Washington DC.
- Nelder J.A. & Mead R. (1965).** A simplex method for function minimization. *Computer Journal*, **7**.
- NF X 06-063. (1987).** "Application de la statistique, comparaison du rapport de deux variances (deux écart-types) à une valeur donnée", Afnor, Paris (Ed.).
- Ngounou C., Ndjouenkeu R., Mbofung F. & Noubi I. (2003).** Mise en évidence de la biodisponibilité de calcium et de magnésium au cours de la fermentation du lait par des bactéries lactiques isolées du lait caillé du Zébu. *Journal of Food Engineering*, **57**, 301-307.
- Obretenova S.D. (1987).** Selection of strains of L. bulgaricus and S. thermophilus to obtain yogurt with continuous cultivation. *Food industry* , **9**, 14-30 (in Bulgarian).
- Ott A., Fay L. B. & Chaintreau A. (1997).** Determination and origin of the aroma impact compounds of yoghurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 850-858.
- Paci Kora E. (2004).** Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impact respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur ?. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique de Paris-Grignon, science des aliments.
- Pelletier J-F., Faurie J-M. & François A. (2007).** Lait fermenté : la technologie au service du goût. In Cahiers de Nutrition et de Dietetique, Volume 42, Issue 2, 18-05-2007, pp. 2S15
- Perez P.F., De Antoni G.L. & Anon M.C. (1991).** Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures. *Journal of Dairy Science*, **74**, 2850-2854.
- Pette J.W. & Lolkema H. (1951).** Yoghurt IV. Factors influencing the proportion of streptococci and lactobacilli in a yoghurt culture. *Net. Milk Dairy*, **5**, 14-26

- Pette J.W. & Lolkema H. (1950).** Acid formation and aroma formation in yoghurt. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **4**, 261-273.
- Pette J.W. & Lolkema H. (1950).** Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, **4**, 197-208.
- Plackett R.L. & Burman J.P. (1946).** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*.
- Prentice J.H. (1992).** Dairy rheology. A concise guide. Food science and technology collection. New York : VCH Publishers, Inc (Ed), New York.
- Prevost H. & Divies C. (1988).** Continuous pre-fermentation of milk by entrapped yoghurt bacteria. II. Data for optimization of the process. *Milchwissenschaft*, **43**, 716-719.
- Racine M., Dumoht J & Morin W. (1991).** Production de polysaccharides microbiens sur des milieux glucidiques en surplus au Québec. Revue du Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en agriculture, **302**, 1-27.
- Radke-Michell L. & Sandine W.E. (1984).** Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: a review, *Journal of Food Protection*. **12**, 383-391.
- Radke-Michell L. & Sandine W.E. (1986).** Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Journal of Dairy Sciences*. **69**, 2558-2568.
- Richardson S.J., Baianu I.C. & Steingerg M.P. (1987).** Mobility of water in sucrose solutions determined by deuterium and oxygen-17 nuclear magnetic resonance measurement. *Journal of Food Science*, **52**, 806-809.
- Rousseau M. (2005).** La fabrication du yaourt, les connaissances. INRA.
- Roussel Y., Pebay M., Guedon G., Simonet J.P. & Decariss B. (1994).** Physical and genetic map of *streptococcus thermophilus* A054. *Journal of Bacteriology*, **176** (24), 7413-7422.
- Schkoda A., Stumph A. & Kessler H. G. (1998).** Stability of texture of fermented milk products in relation to composition. In Texture of fermented milk products and dairy dessert. Proceedings of the IDF Symposium. Vicenza. Italy. 5-6 May 1997. 115-121.
- Schkoda P., Hechler A. & Hinrichs J. (2001).** Influence of the protein content on structural characteristics of stirred fermented milks. *Milchwissenschaft*, **56**, 19-22.

- Schmidt J.L., Tourneur C. & Lenoir J. (1994).** Fonction et choix des bactéries lactiques laitières. *In* bactéries lactiques. pp. 37-46. ed. De Roissart, H. et Luquet, F.M., II, Lorica, paris.
- Simova E. PhD. (2007).** Thesis, Theoretical and application aspects of milk products starter cultures, NIHFI, Plovdiv, p. 391 (in Bulgarian).
- Singh Sudheer K., Ahmed Syed U. & Ashkor P. (2006).** Yogurt science and technology, 2nd Ed. Cambridge, woodhead Publishing.
- Singh J. (1983).** Influence of heat-treatment of milk and incubation temperatures on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *Milchwissenschaft*, **38**, 347-348.
- Spendley W., Hext G.R. & Himsworth F.M. (1962).** Sequential application of simplex designs in optimization and evolutionary operation. *Technometrics*, **4**.
- Tamime A.Y. & Deeth H.C. (1980).** Yoghurt : technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, **43** (12), 939-977.
- Tamime A.Y. & Robinson R.K. (1985).** Background to manufacturing practice. *In* Yoghurt. Science and technology. pp. 7-90. ed. Tamime, A.Y. et Robinson, R.K., Pergamon Press, Paris.
- Tamime A.Y. & Robinson R.K. (1999).** Yogurt science and technology, 2nd Ed. Cambridge, woodhead Publishing.
- Tamime Y. A., Robinson R. K., & Latrille E. (2001).** Yoghurt and other fermented milks. *In* Y. A. Tamime, & B. A. Law (Eds.), Mechanization and automation in dairy technology (pp. 152–203).
- Tamime A.Y., Robinson R.K. (2003).** *Yogurt: Science and technology*, CRC Press, New York, p. 661
- Tammam J.D., Williams A.G., Noble J. & Lloyd D. (2000).** Amino acid fermentation in non-starter *Lactobacillus* ssp. isolated from Cheddar cheese, *Letters in Applied Microbiology*, **30**, 370-374.
- Tayeb J., Bouillanne C. & Desmazeaud M.J. (1984).** Computerized control of growth with temperature in a mixed culture of lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation Technology*, **62**, 461-470.
- Teixeira P.C.M. (2000).** *Lactobacillus* : *Lactobacillus bulgaricus*. *In* Encyclopedia of Food Microbiology. pp. 1136-1144. ed. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., Academic Press, London.
- Terzaghi B.E., Sandine W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, **29**, 807-813.

- Thunell R.K., Sandine W.E. (1985).** Types of starter cultures. In *Bacterial starter cultures for foods*. S.E. Gilliland (Eds.), CRC Press, Florida, 127-132.
- Torriani S., Gardini F., Guerzoni M. E., & Dellaglio F. (1996).** Use of response surface methodology to evaluate some variables affecting the growth and acidification characteristics of yogurt cultures. *International Dairy Journal*. **6**, 625–636.
- Vali M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D. & Mattanovich D. (2006).** Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisia* by cell sorting for height intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (8), 5492-5499.
- Van Marle M. (1998).** Structure and rheological properties of yoghurt gels and stirred yoghurts. Thèse. Université de Twente, Enschede, Pays Bas.
- Viennet R., (1997).** Nouvelle méthodologie de planification expérimentale pour l'optimisation multicritères de procédés. Thèse. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Vignola C. I. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du lait. Lavoisier (Ed.), Paris.
- Vivier S. (2002).** Stratégie d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis. Thèse.
- Walter E., Pronzato L. (1994).** Identification of parametric models. *Communications and Control Engineering Series*. Springer-Verlag, Berlin.
- Walter F.H., Lloyd R., Parker J.R., Morgan S. & Deming S. (1991).** Séquentiel Simplex Optimisation, A Technique for Improving Quality and Productibility in Research, Development and Manufacturing. *CRC Press*. Boca Raton (Ed.).
- Wiechert W. (2002).** Modeling and simulation : tools for metabolic engineering. *Journal of Biotechnology*, **94**, 37-63.
- Yaygin H. (1970).** Recherches sur les températures optimales de développement de *Lb. bulgaricus* et *St. thermophilus* et influence de quelques facteurs sur leurs activités communes. *Le Lait* , **49**, 439-445.
- Zirnstien G. & Hutkins R., (2000).** *Streptococcus : Streptococcus thermophilus*. In Encyclopedia of Food Microbiology. pp. 2127-2133. ed. Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D., Academic Press, London.
- Zourari A., Accolas J.P. & Desmazeaud M.J. (1992).** Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria : A review. *Lait*, **72**, 1-34.

## RESUME

La concentration d'acide lactique et la texture du yaourt change en fonction de facteurs chimiques, physiques et microbiologiques, à savoir la température d'incubation, le rapport entre les deux souches utilisées dans la fabrication (streptocoques/lactobacilles), la taille d'inoculum ainsi que le taux de sucre et de lait en poudre ajouté.

Une approche méthodologique pour la modélisation du procédé de fabrication du yaourt a été suivi afin de trouver les paramètres optimaux, par l'utilisation de plans d'expériences permettant d'organiser au mieux les essais servant à constituer une base de données pour l'établissement et la validation des modèles.

La modélisation par plans d'expériences, nous a permis dans un premier temps de sélectionner les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur le procédé de fabrication en suivant un plan d'expérience dit de criblage à 5 facteurs et 8 essais. À l'issue de cette étape, nous avons conclu qu'il y avait 3 facteurs ayant une influence statistiquement significative, ce qui nous a conduit dans un second temps à optimiser ce procédé en utilisant un plan dit composite centré réduit à 3 facteurs et 17 essais suite auquel nous avons pu écrire l'équation qui relie la réponse aux facteurs étudiés nous permettant ainsi de calculer la valeur optimale de chaque paramètre.

L'analyse graphique et mathématique des modèles obtenus nous a permis d'avancer que la température optimale de la fabrication du yaourt gravite au alentour de 47°C et que le pourcentage de lait en poudre et de sirop glucosé ajouté était aux alentours de 7 et 3%, respectivement.

L'analyse statistique des modèles a témoigné de leur robustesse avec un coefficient de régression proche de 1 pour les deux modèles. De plus les résultats issus des essais ayant servi à l'ajustement des paramètres sont similaires à ceux calculés par le modèle.

## ABSTRACT

The lactic acid concentration and texture of yogurt changes depending on chemical, physical and microbiological that is incubation temperature, the ratio between the two strains used in the manufacture (streptococci / lactobacilli), the size of inoculum and the rate of sugar and milk powder added.

A methodological approach for modeling the processes of yogurt was followed to find the optimal parameters by using experimental designs to better organize the tests used to establish a database for the establishment and validation of the models. Modeling experimental design allowed us to, first select the factors which have statistically influence significant on the processes following an experimental design called screening with 5 factors and 8 tests. After this stage, we concluded that there were three factors with a statistically influence significant, which led us in a second time to optimize this process using a design called central composite reduced to 3 factors and 17 tests. After this we could write the equation that relates the response to factors studied allowing us to calculated the optimal value of each parameter.

Graphical analysis and mathematical models obtained allowed us to suggest that the optimal temperature for making yogurt is around the 47 ° C and the percentage of milk powder and glucose syrup was added around 7 and 3%, respectively.

Statistical analysis of the models showed their robustness with a regression coefficient close to 1 for both models. The results from tests used to adjust the parameters are similar to those calculated by the model.

## ملخص

تركيز حمض اللاكتيك وملس الزبادي يتغيران تبعاً لعوامل الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية، و هي درجة حرارة، النسبة بين سلالتين المستخدمة (العقديات / العصيات اللبنية)، حجم اللقاح ونسبة السكر والحليب المجفف المضاف. تم إتباع خطة منهجية لنمذجة عملية تصنيع الزبادي و هذا للعثور على أفضل المعايير، باستخدام تصاميم تجريبية لتنظيم أفضل للتجارب المستخدمة لإنشاء قاعدة البيانات لتأسيس النماذج و التحقق من صحتها.

تسمح النمذجة بالتصاميم التجريبية أولاً بتحديد العوامل المؤثرة ذات دلالة إحصائية على عملية التصنيع بإتباع تصميم تجريبي للفرملة ب 5 عوامل و 8 تجارب، الذي سمح لنا بالتوصل على ثلاثة عوامل، و ثانياً بتحسين العملية باستخدام تصميم تجريبي مركب ل 3 عوامل و 17 تجربة والذي أمكننا بكتابة المعادلة التي تربط بين العوامل و الردود المحصل عليها مما يسمح لنا بحساب القيمة المثلى لكل عامل.

تشير التحليل للرسوم البيانية والنماذج الرياضية بأن درجة الحرارة المثلى لصنع الزبادي تدور حول م 47 °، أما بالنسبة لمسحوق الحليب وشراب الجلوكوز المضاف فهما حوالي 7 و 3٪ على التوالي.

أظهر التحليل الإحصائي للنماذج قوتها مع معامل الانحدار قريب من 1 لكلا النموذجين. بالإضافة إلى أن النتائج المحصل عليها من التجارب المستخدمة لضبط العوامل مشابهة لتلك التي تحصلنا عليها باستخدام النموذجين.



## RESUME

La concentration d'acide lactique et la texture du yaourt change en fonction de facteurs chimiques, physiques et microbiologiques, à savoir la température d'incubation, le rapport entre les deux souches utilisées dans la fabrication (streptocoques/lactobacilles), la taille d'inoculum ainsi que le taux de sucre et de lait en poudre ajouté. Une approche méthodologique pour la modélisation du procédé de fabrication du yaourt a été suivie afin de trouver les paramètres optimaux, par l'utilisation de plans d'expériences permettant d'organiser au mieux les essais servant à constituer une base de données pour l'établissement et la validation des modèles. La modélisation par plans d'expériences, nous a permis dans un premier temps de sélectionner les facteurs ayant une influence statistiquement significative sur le procédé de fabrication en suivant un plan d'expérience dit de criblage à 5 facteurs et 8 essais. À l'issue de cette étape, nous avons conclu qu'il y avait 3 facteurs ayant une influence statistiquement significative, ce qui nous a conduit dans un second temps à optimiser ce procédé en utilisant un plan dit composite centré réduit à 3 facteurs et 17 essais suite auquel nous avons pu écrire l'équation qui relie la réponse aux facteurs étudiés nous permettant ainsi de calculer la valeur optimale de chaque paramètre. L'analyse graphique et mathématique des modèles obtenus nous a permis d'avancer que la température optimale de la fabrication du yaourt gravite au alentour de 47°C et que le pourcentage de lait en poudre et de sirop glucosé ajouté était aux alentours de 7 et 3%, respectivement. L'analyse statistique des modèles a témoigné de leur robustesse avec un coefficient de régression proche de 1 pour les deux modèles. De plus les résultats issus des essais ayant servi à l'ajustement des paramètres sont similaires à ceux calculés par le modèle.

### **Mots clés :**

Modélisation; Yaourt; Plan D'expérience; *Streptococcus Thermophilus*; *Lactobacillus Bulgaricus*; Criblage; Surface De Réponse; Souche; Acidification; Plan Composite Centré.