

TP n°7 : Observations macroscopiques et microscopiques au cours de la fabrication du yaourt et suivi de la fermentation lactique

Comment évolue l'aspect du lait au cours de la fabrication du yaourt ? La flore microbienne du yaourt évolue-t-elle ?

Pourquoi le lait coagule-t-il au cours de sa fabrication ? Le yaourt est-il plus acide que le lait ?

Contexte : Julie est pressée. Obtiendra-t-elle des yaourts si elle arrête leur fabrication au bout de 1, 2, 3 ou 4 heures ?

I. La fermentation du lait en yaourt et évolution macroscopique

✓ Matériel et réactif

- 1 fiole d'Erlenmeyer avec 190 mL de lait UHT
- Pipettes graduées stériles de 10 mL
- Tubes à essai
- Bac à glace
- 1 yaourt
- 1 bain thermostaté à 44°C

✓ Mode opératoire

- Agiter fermement le yaourt avant de l'ouvrir.
- Au temps 0h, introduire 10 mL de yaourt dans 190 mL de lait UHT préalablement tiédi à 44°C
- Incuber la fiole d'Erlenmeyer dans un bain à 44°C agité.
- Au temps 0h, 1h, 2h, 3h et 4h :
 - Bien homogénéiser et transférer 2 fois 10 mL dans 2 tubes à essai (la première série sera notée M0, M1, M2, M3 et M4 et la deuxième A0, A1, A2, A3 et A4).
 - Placer les différents prélèvements dans un bain à glace.
 - Poursuivre la fermentation en laissant la fiole d'Erlenmeyer dans le bain thermostaté agité jusqu'au temps 18h. Stocker ensuite la fiole à 4 °C.

✓ Compte rendu

- 1) Pourquoi placer à 44°C la fiole de laitensemencé par 10 mL de yaourt ?
- 2) Pourquoi placer les différents prélèvements dans un bain de glace ?
- 3) Décrire la consistance contenue dans les tubes 0, 1, 2, 3 et 4h de fermentation. Comment évolue l'aspect macroscopique du lait fermenté au cours du temps ?
- 4) Nommer le phénomène physico-chimique observé.

II. Observations microscopiques des bactéries au cours de la fermentation

Les observations microscopiques doivent permettre de comparer les concentrations en microorganismes au cours de la fermentation. Pour cela, 10 µL de chaque prélèvement sont déposés et étalés de manière comparable sur une lame puis coloré au bleu de méthylène.

✓ **Matériel et réactif**

- Les différents prélèvements M0, M1, M2, M3 et M4 à 0°C
- Anse calibrée de 10 µL
- Bleu de méthylène

✓ **Mode opératoire**

- Dessiner un carré de 1 cm² sur une lame à l'aide d'un marqueur.
- Étaler 10 µL de chaque prélèvement dans chacun de ces carrés à l'aide de l'anse calibrée de 10 µL.
- Fixer le frottis puis colorer le au bleu de méthylène.
- Déterminer le nombre de moyen de microorganismes par champs (noté n) en observant 10 champs.

✓ **Compte rendu**

- 5) Établir un tableau donnant pour chaque prélèvement : la description des observations microscopiques, et « n », le nombre moyen de microorganismes par champs microscopique.
- 6) Quelles sont les deux morphologies microbiennes observées ?
- 7) Comment évolue qualitativement et quantitativement la flore microbienne au cours de la fermentation du yaourt ?

III. Suivi de la fermentation lactique au cours de la fabrication du yaourt

✓ **Matériel et réactif**

- Prélèvements M0, M1, M2, M3 et M4 à 0°C
- Prélèvements A0, A1, A2, A3 et A4 à 0°C
- Fiole d'Erlenmeyer de lait fermenté après 18h à 44°C
- Pots de yaourt vides
- Papier pH
- Indicateurs de pH : Rouge de méthyle (RM) et bleu de bromothymol (BBT)
- pH-mètre + solution étalon pH 4 et 7

✓ **Mode opératoire : estimation du pH à l'aide du papier pH**

Le papier pH permet d'estimer le pH au début (M0) et à la fin (temps 18h) de la fermentation du lait en yaourt. Cet intervalle de pH permettra de choisir des indicateurs de pH appropriés pour la suite du TP.

- Homogénéiser les prélèvements M0 et la fiole d'Erlenmeyer de lait fermenté de 18h.
- Déposer une goutte à l'aide d'un compte-goutte sur un morceau de papier pH.
- Évaluer le pH de chaque prélèvement en comparant la coloration obtenue à celle de l'abaque fourni par le fabricant du papier pH.

✓ **Mode opératoire : estimation du pH à l'aide d'indicateur de pH**

- Homogénéiser les prélèvements M0 à M4 ainsi que la fiole d'Erlenmeyer de lait fermenté de 18h.
- Transférer 2x1 mL de chaque prélèvement (M0 à M18) dans 2 tubes à hémolyse.
- Ajouter, dans chaque tube, à hémolyse 2 à 3 gouttes d'indicateur de pH. Pour déterminer quels indicateurs utiliser, utiliser l'intervalle de pH estimé à l'aide du papier pH et le document 1 de la page 81 de votre livre.
- Évaluer le pH de chaque prélèvement en comparant la coloration obtenue aux couleurs de l'indicateur de pH en fonction du pH.

✓ **Mode opératoire : estimation du pH à l'aide d'un pH-mètre**

- Homogénéiser les prélèvements A0, A1, A2, A3 et A4 ainsi que la fiole d'Erlenmeyer de lait fermenté de 18h.
- Pour chaque prélèvement et la fiole : vider le tube correspondant dans un pot de yaourt puis rincer le tube avec de l'eau distillée en recueillant les eaux de rinçage.
- Ajuster le pH-mètre en utilisant les solutions étalons pH 4 et 7.
- Relever le pH pour chaque prélèvement.
- Après chaque mesure, rincer l'électrode **au-dessus** du bécher de mesure.
- Conserver l'ensemble des béchers pour le dosage volumétrique de l'acide lactique.

➔ **Remarque : l'électrode de pH est très fragile. Il faut veiller à ne pas la laisser trop longtemps dans les différents prélèvements riches en protéines.**

✓ **Compte rendu**

8) Remplir le tableau ci-dessous :

Temps de fermentation (heure)	0	1	2	3	4	18
pH estimé avec papier pH						
pH estimé avec l'indicateur 1						
pH estimé avec l'indicateur 2						
pH mesuré par le pH-mètre et corrigé*						

**Remarque* : on admettra une correction de -0,15 sur le pH car le prélèvement a été dilué avec l'eau de rinçage ce qui fausse le résultat.

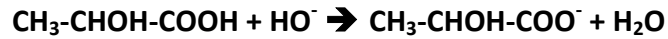
9) Lister les avantages et les inconvénients **pour chaque méthode** de mesure du pH.

10) Comment évolue le pH au cours de la fabrication du yaourt ?

11) Expliquer cette évolution.

IV. Dosage de l'acide lactique par volumétrie

L'acide lactique produit lors de la fabrication du yaourt est dosé par volumétrie en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) de concentration exacte et connu d'environ $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. L'équation de la réaction chimique est la suivante :



✓ Matériel et réactif

- Prélèvements A0, A1, A2, A3, A4 et A18 obtenus à l'issue des mesures au pH-mètre
- Burette
- Bécher 25 mL
- Phénolphtaléine
- Fioles d'Erlenmeyer de 250 mL
- Solution NaOH étalonnée à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$

✓ Mode opératoire

- Transvaser le contenu de chaque pot de yaourt en fiole d'Erlenmeyer de 250 mL.
- Rincer et recueillir les eaux de rinçage.
- Ajouter 4 gouttes de phénolphtaléine.
- Remplir la burette de NaOH à l'aide du bécher.
- Doser chaque prélèvement jusqu'à virage au rose persistant pendant au moins 10 secondes.

➔ ATTENTION : UNE GOUTTE SUFFIT POUR PERMETTRE LA PERSISTANCE DE LA COLORATION. N'ALLEZ DONC PAS TROP VITE ET FAITES DU GOUTTE À GOUTTE !!

✓ Compte rendu (Cf. FM 2)

- 12) Établir un tableau de résultats donnant le volume équivalent de NaOH pour chaque prélèvement.
- 13) Schématiser le mode opératoire.
- 14) Pourquoi est-il utile de rincer les pots de yaourt et de récupérer les eaux de rinçage ?
- 15) Comment évolue le volume équivalent entre le prélèvement A0 et le A18 ? Que montre cette évolution ?
- 16) Calculer les différentes concentrations en acide lactique $\rho_{(\text{acide lactique ds lait fermenté A0 à A18})}$ en g.L^{-1} avec **2 chiffres significatifs**, en établissant :
 - l'équation aux grandeurs,
 - l'équation aux unités
 - l'équation aux valeurs numériques.

Donnée : $M_{(\text{acide lactique})} = 90 \text{ g.mol}^{-1}$

- 17) Comment évolue la concentration en acide lactique au cours de la fermentation ?
- 18) Quelle est l'origine de cette évolution ?