

Consommer des produits fermentés revient à consommer des micro-organismes vivants qui ont un effet positif sur la santé : on parle de probiotiques. C'est le cas du kéfir de fruit, une boisson pétillante préparée avec des grains de kéfir, un peu de citron, du sucre, de l'eau et quelques fruits secs. Les grains de kéfir, qui sont des micro-organismes vivants, sont le résultat d'une symbiose de bactéries et de levures entourées d'une matrice de polysaccharides.

D'après les archives historiques [4], le kéfir de fruit est consommé depuis l'Antiquité, son origine est peu connue mais elle a surtout été utilisée en Russie par des tribus nomades. Cependant, cette boisson peu connue voire oubliée revient et est de plus en plus en vogue. En effet, elle peut être vue comme une alternative plus saine à la limonade.

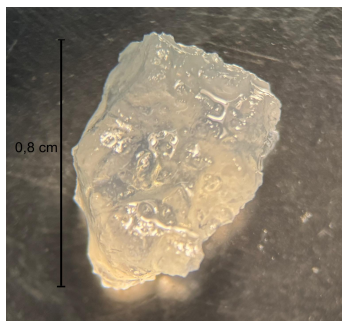
I. Présentation

a. Les grains de kéfir

Les grains de kéfir sont des structures constituées d'une symbiose de levures et de bactéries, ils constituent un biofilm naturel. En effet, les levures et les différents types de bactéries sont unies par une matrice extracellulaire présentant une texture gélatineuse de polysaccharides. Cette structure permet aux micro-organismes de communiquer et de coopérer pour assurer le processus de fermentation.

Le biofilm des grains de kéfir joue un rôle essentiel dans leur survie et leur activité. Il assure aux microorganismes une protection contre les agressions extérieures comme les fluctuations de pH tout en favorisant les échanges métaboliques entre les levures et les bactéries.

Nous avons mesuré la taille de quelques grains dans des conditions standards (température ambiante...). Nos grains mesurent en moyenne environ 0,8 cm. Cependant les grains ont des tailles variables. Cette mesure n'a donc pas pour but de connaître la taille précise mais simplement de donner un ordre de grandeur. L'autre intérêt de mesurer la taille d'un grain est de pouvoir par la suite l'utiliser en tant que témoin afin de comprendre les effets des différentes conditions (température ou acidité) sur ces grains. Nous aborderons ces aspects dans les expériences suivantes.



b. La boisson

• Préparation

Pour toutes nos expériences (sauf contre-indications), voici la manière dont nous avons préparé notre kéfir :

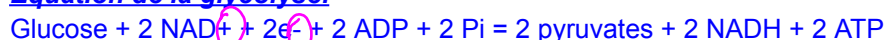
- 4 g de grains de kéfir
- 4 g de sucre en poudre
- 200 mL d'eau

Il s'agit de la préparation dite « classique » pour obtenir la boisson appelée « kéfir » à partir des grains de kéfir de fruits.

• Les interactions dans le kéfir à l'origine de la boisson :

Toutes les cellules ont besoin de se fournir en ATP. Pour produire cet ATP, ces unicellulaires font la glycolyse, une suite de 10 réactions enzymatiques se déroulant dans leur cytosol au cours desquels le glucose est partiellement oxydé. La glycolyse peut fonctionner même en absence de dioxygène.

Equation de la glycolyse:



exposant
do même
positif

Cependant, en absence d'oxygène, leurs mitochondries ne peuvent pas fonctionner. Le seul moyen de produire de l'ATP est donc la glycolyse, bien qu'elle en produise peu. Mais pour fonctionner, la glycolyse a absolument besoin de NAD^+ qui joue le rôle d'accepteurs d'électrons.

Les micro-organismes réalisent donc des fermentations pour réoxyder du NADH en NAD^+ .

Les levures présentes dans ces grains de kéfir réalisent la fermentation alcoolique :

Pyruvate = CO_2 + acétaldéhyde (1^e étape)

Acétaldéhyde + NADH = éthanol + NAD^+ (2^e étape)

Cette première étape rend la boisson légèrement pétillante et apporte un faible taux d'alcool (souvent inférieur à 1%).

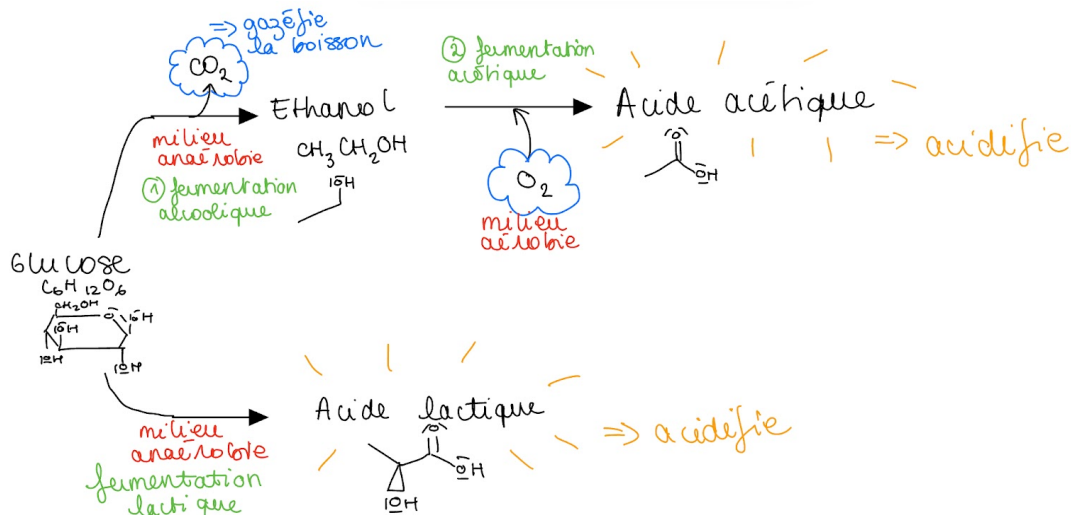
Parallèlement, les bactéries lactiques réalisent la fermentation lactique :

Pyruvate + NADH => acide lactique + NAD^+

Dans un second temps, quand on ouvre le bocal (milieu aérobie), une fermentation acétique a lieu : la faible quantité d'éthanol est transformée en acide acétique :

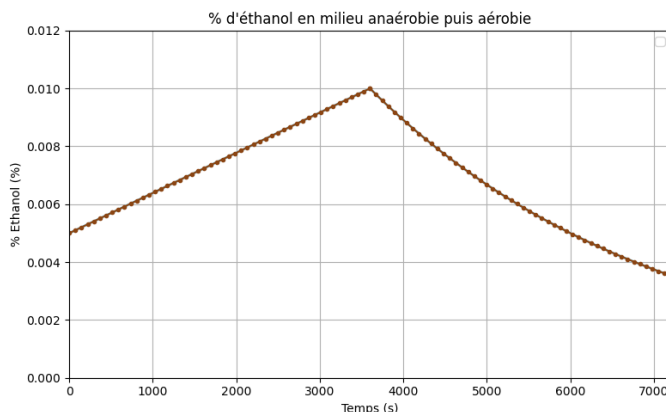
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$

Ce processus crée un environnement acide qui freine la multiplication de micro-organismes indésirables et donne au kéfir un goût légèrement acide. À l'issue de ces fermentations, la boisson obtenue est pétillante, légèrement alcoolisée, riche en probiotiques ce qui est bénéfique pour la flore intestinale (5)



Mise en valeur expérimentale de la fermentation alcoolique en milieu anaérobie puis acétique en milieu aérobie :

Nous avons mesuré le pourcentage d'alcool dans le kéfir au cours du temps grâce à une sonde à éthanol dans un bocal hermétiquement fermé puis ouvert à $t=1\text{h}$:



On observe une augmentation de la teneur en alcool en milieu anaérobie due à la fermentation alcoolique puis une diminution de celle-ci due à sa consommation par la fermentation acétique qui a lieu en milieu aérobie.

II. Optimisation de la préparation

à ce
n'y ait qu'il
du kéfir
en bas
du pot.

a. Présentation des paramètres mesurés

Dans cette partie, nous nous intéressons aux variations des différents paramètres (pH et température) afin de déterminer les conditions optimales de croissance des microorganismes. Ces expériences consistent à faire varier un de ces paramètres à la fois et de garder les autres constants.

À ces optimums, les bactéries et les levures sont dans leurs conditions idéales de croissance, ce qui leur permet de se multiplier de manière active et de produire une grande quantité de polymères glucidiques, constituant principal de la matrice extracellulaire du biofilm des grains.

La croissance de la population microbienne est estimée par l'augmentation de la masse des grains après quelques jours (due à leur multiplication) et le métabolisme fermentaire des micro-organismes du Kéfir est mesuré par le suivi du dégagement de CO_2 ou d'acide (diminution du pH) au cours de ces 48h.

Nous quantifions les vitesses de fermentation grâce à la mesure du CO_2 ou du pH par une sonde au cours du temps lors des premières 48h. Nous extrayons les pentes des courbes ainsi obtenues afin de les comparer entre elles et donc de comparer leur vitesse de fermentation (plus la pente est grande, plus la fermentation est rapide).

La solubilité du CO_2 variant selon la température, nous avons choisis de quantifier la fermentation en fonction de la température par diminution du pH.

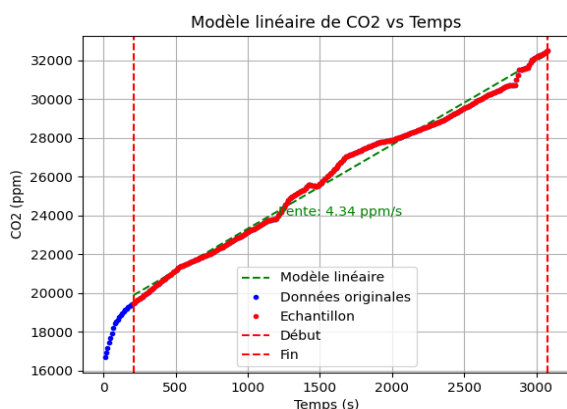
Nous quantifions la masse grâce à une balance d'incertitude 0,05. Dans les expériences suivantes, le fait de mesurer la masse des grains mis dans des conditions spécifiques permet de mesurer (avec comme critère de comparaison la valeur du témoin dans des conditions standards) la prolifération bactérienne et donc la vitesse de fermentation selon les différentes conditions. En effet, plus elles sont nombreuses, plus elles fermentent.

b. Optimum de pH

5 lots de 5 kéfirs sont préparés selon la recette p.2 et le pH mesuré avec une sonde pH est ajusté à 2, 3, 4, 5 et 7 avec des gouttes de citron. Chacun des lots est placé à température ambiante.

Au bout d'une semaine, nous avons mesuré la masse des grains. La vitesse de fermentation est mesurée grâce à une sonde CO_2 PASCO pour chaque pH avec le montage ci-contre.

Toutes les vitesses ont été calculées grâce à la valeur du coefficient directeur des courbes de mesures. Ci-dessous la courbe de CO_2 en fonction du temps pour le pH 5 :



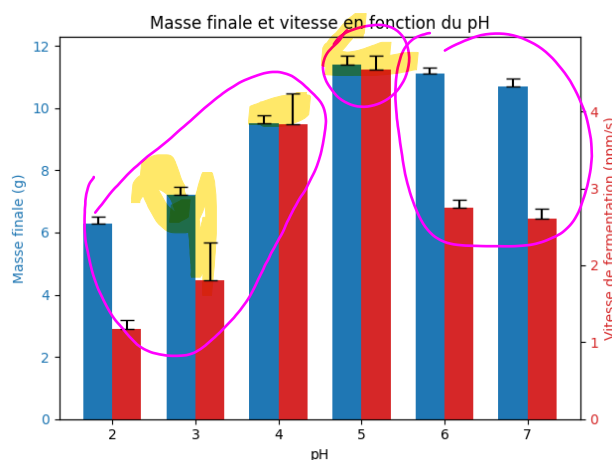
(*) temps d'adaptation



A tenez vous à la question d'incertitude du coefficient (en partie - bien pour v.

On remarque ainsi un optimum de pH à 5: les grains se reproduisent plus vite et fermentent plus vite.

À la borne d'incertitude le max

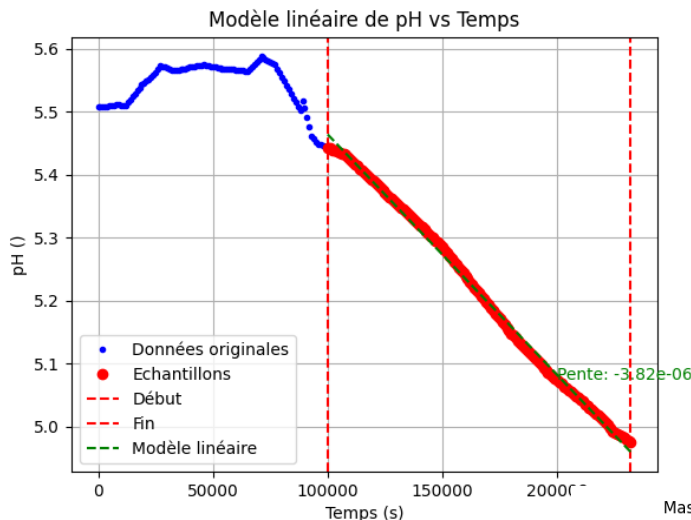


c. Optimum de température

Nous avons préparé 4 lots de 5 kéfirs avec notre recette p 2. On laisse les kéfirs à différentes températures (respectivement 3°C, 10°C, 20°C et 30°C) pendant 48h, à pH=5. Au bout de 48h, nous avons mesuré la masse des grains et la vitesse de fermentation, par mesure du pH, de chaque préparation de kéfir.

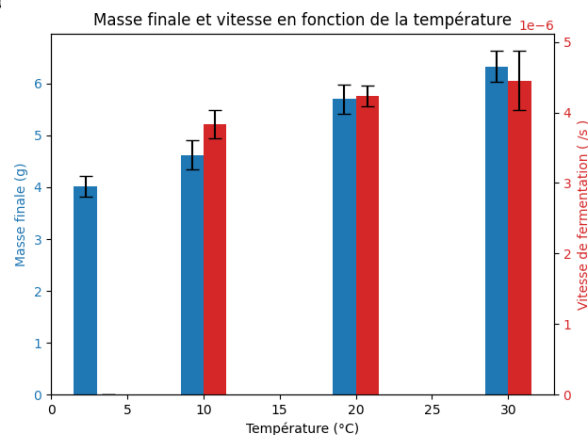
RÉSULTATS :

Toutes les vitesses ont été calculées grâce à la valeur du coefficient directeur des courbes de mesures. Ci-dessous la courbe de pH en fonction du temps à 10°C :



(*) temps d'adaptation

On observe ainsi qu'à 30°C la multiplication des bactéries et leurs fermentations est favorable. On ne peut pas conclure à un optimum mais on peut noter qu'au-delà de 50°C certaines souches peuvent mourir.



Q1
i don
sans d'in
Q2
Pourquoi ne
pas avoir
été au delà
de 30?

III. Les propriétés du kéfir

a. Résistance

Le kéfir est un biofilm qui a montré par sa longévité (depuis l'Antiquité), sa grande capacité de résistance à des milieux difficiles.

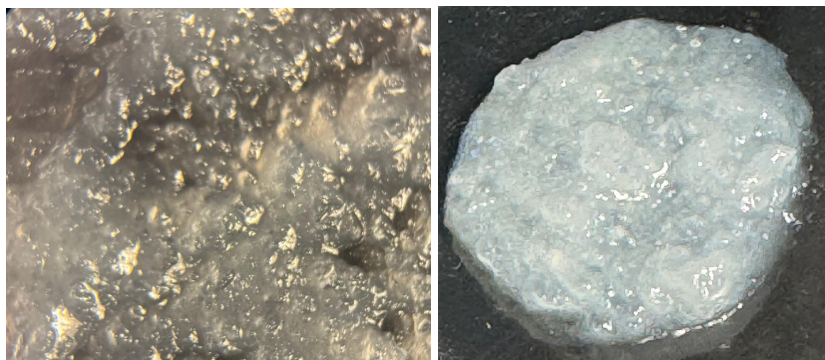
Les grains se multipliant, l'utilisateur peut être amené à conserver des grains dans certaines conditions pour les utiliser plus tard.

Nous avons pu mettre en valeur les propriétés mécaniques du kéfir. En effet, nous avons introduit des grains de kéfir dans un pilon et nous les avons broyés ce qui nous a permis de faire un gel [1], qui se conserve de manière durable.

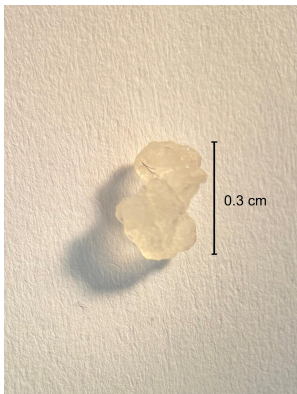
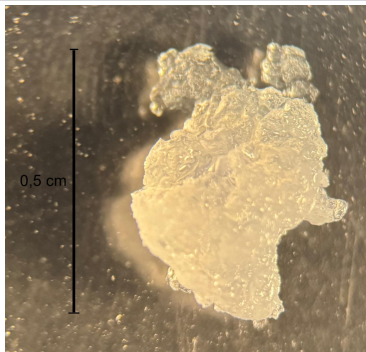
Des chercheurs ont aussi mis en évidence que le gel des grains de kéfir de fruit à des vertus cicatrisantes et assainissantes (cf bibliographie)

↑
mettre le
no de la
ref associée.

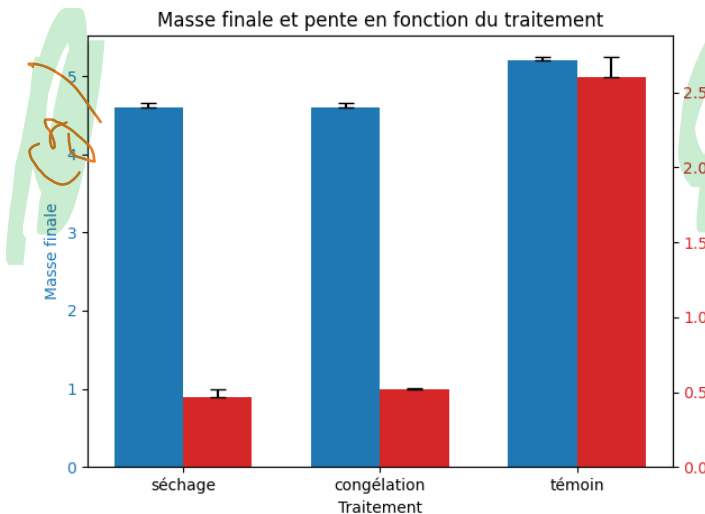
Aspect à la loupe binoculaire :



Congeler ou sécher des grains sont aussi des moyens de conservation envisageables. Pour cela nous avons confronté des grains de kéfir à la sécheresse et à la congélation. Nous avons aussi pris un témoin de 4g de grains n'ayant subi ni séchage ni congélation.

Condition	Séchage	Congélation
Protocole	Nous avons mis à sécher pendant une semaine à l'air libre 4g de grains de kéfir qui ont pris un aspect sec et qui ont perdu 90% de leur masse	Nous avons congelé 4g de grains pendant 3 jours à (-18°C). Les grains semblent garder la même taille et la même masse
Aspect	On remarque que la taille a été réduite (passe d'environ 0,8 cm à 0,3 cm) ce qui est cohérent avec la perte d'eau due au séchage. 	

Puis nous avons réalisé 3 kéfirs avec la recette habituelle mais en utilisant ces 3 lots de grains et nous avons étudié leur fermentation et leur multiplication de la même manière que pour les optimaux, avec une sonde CO₂.
RÉSULTATS :



Toutes les vitesses ont été calculées grâce à la valeur du coefficient directeur des courbes du CO₂ en fonction du temps. La masse finale après une congélation ou un séchage est significativement plus faible que la masse finale du témoin mais plus grande que les 4g initiaux.

La multiplication des grains est donc plus faible du fait des conditions « extrêmes ». Il y a moins de micro-organismes pouvant faire la fermentation, ce qui permet d'expliquer que les vitesses de fermentation dans ces conditions extrêmes soient moins rapides que celle du témoin.

b. Boisson pauvre en sucre

Le kéfir est une boisson qui se différencie des boissons industrielles, notamment par sa teneur en sucre beaucoup plus faible que celle des limonades de grandes surfaces.

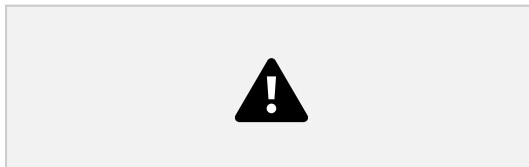
Par exemple, la limonade de la marque « Lorina » contient 100 g/L de sucre.

Alors que dans le kéfir commercial, on peut retrouver une concentration 2 à 3 fois moindre.

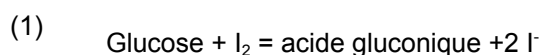
Nous avons alors cherché à vérifier cette information en dosant le saccharose présent dans une boisson de kéfir commerciale.

PROTOCOLE :

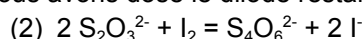
Nous avons d'abord hydrolysé en milieu acide 20 mL de kéfir afin de transformer le saccharose restant de la boisson en glucose et fructose grâce à un montage à reflux selon l'équation:



Puis nous avons fait réagir le glucose présent avec une solution de 40 mL de diiode de concentration $1,00 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$:



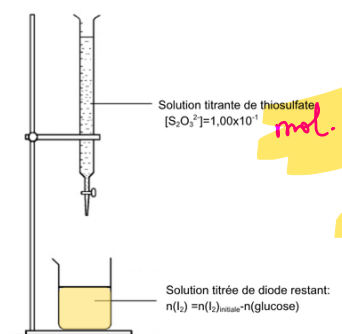
Enfin nous avons dosé le diiode restant avec une solution thiosulfate :



A l'équivalence, les produits sont introduits en proportion stœchiométrique :

$$n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})/2 = n(\text{I}_2)$$

Or en supposant la réaction (1) totale, $n(\text{I}_2) = n(\text{I}_2)_{\text{initiale}} - n(\text{glucose})$



On peut donc ainsi retrouver la concentration en glucose initiale

RÉSULTATS :

Ainsi, nous avons trouvé un volume équivalent de 45 mL qui nous a permis de trouver une concentration en saccharose de $8,75 \pm 0,04 \times 10^{-2}$ mol/L et donc de $29,95 \pm 0,1$ g/L.

Les incertitudes ont été déterminées grâce à la méthode Monte Carlo

On retrouve bien une concentration en saccharose 4 fois plus faible que dans les sodas traditionnels.

c. Bienfaits

Cette boisson a notamment des effets bénéfiques directs sur notre organisme. En effet, les bactéries du kéfir restant dans la boisson peuvent entrer en compétition avec certains pathogènes de notre système digestif comme *E. coli*.

Nous avons testé l'effet antiseptique du kéfir sur une culture d'*E. coli* [2], une bactérie dont certaines souches sont pathogènes.

Les colibacilles sont cultivés en boîtes de Pétri sur un milieu gélosé ad hoc, constitué d'extrait de levure, de glucose, de peptone et solidifié à l'agar-agar. Sur la boîte-test, on dépose 250 microL de kéfir et 250 microL de *E. coli* et on fait 2 témoins : 1 boîte avec 250 microL d'*E. coli* sans kéfir et une boîte avec 250 microL de kéfir sans *E. coli* pour distinguer les 2 types de bactéries.



E. coli seul

Kéfir + *E. coli*

Kéfir seul

RÉSULTATS :

On observe uniquement des bactéries du même aspect que celles du kéfir dans la boîte avec *E. coli* et le kéfir.

Nous avons réitéré à de multiples reprises ces expériences en observant quasi-systématiquement que lorsqu'on cultive les colibacilles en présence de kéfir, ces dernières disparaissent, laissant uniquement place aux bactéries du kéfir.

On en conclut que les bactéries du kéfir empêchent la prolifération des *E. coli*. Il existe donc une compétition entre les bactéries du kéfir et les bactéries *E. coli*, parfois pathogènes qui cause de nombreuses pathologies (diarrhées, gastro-entérites...).

Le kéfir pourrait donc prévenir et agir dans la guérison de nombreuses pathologies liées à la bactérie coli.

Pour conclure, nous avons tout d'abord étudié les différentes fermentations faites par les grains de kéfir afin de comprendre leur rôle dans la transformation d'eau en kéfir.

Nous avons ensuite cherché à optimiser le rendement de la boisson en termes de fermentation et de grains récoltés. Elle a un rendement optimum si elle est mise dans certaines conditions (pH=5 et T=30°C), ces conditions ne sont pas extrêmes et peuvent être facilement mises en place pour une production industrielle.

Enfin nous avons montré que le kéfir se conserve très bien en condition extrême grâce à sa capacité de résistance. De plus, le kéfir présente des propriétés au niveau de la santé, à travers ses pouvoirs

cicatrisants et antiseptique que l'on a démontré par la compétition avec des bactéries potentiellement pathogènes comme *E. Coli*.

Le kéfir peut donc être un élément clé de notre transition alimentaire, dans une optique de santé publique, afin d'éviter la surconsommation de boissons extrêmement sucrées qui ne présentent que très peu d'intérêt pour l'organisme.

Ces grains sont donc une alternative durable et saine pour notre organisme.

Bibliographie :

[1] Gel de kéfir cicatrisant et antibactérien:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857905000543>

[2] Kéfir contre Coli:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095671351630024X>

[3] Stabilisation du kéfir:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030296764445>

[4] Article du MNHN sur la provenance du kéfir:

<https://www.mnhn.fr/fr/qu-est-ce-que-le-kefir-et-d-ou-vient-il>

[5] Bienfaits du kéfir:

<https://www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1252>

[6] Composition du kéfir d'après deux articles:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160521000878>

<https://iads.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fft2.200>