



Université Sidi Mohamed Ben Abdallah
Faculté des Sciences et Technique Fès



LST Biotechnologie Hygiène et Sécurité des Aliments

PROJET DE FIN D'ETUDES

Suivi bactériologique de La préparation des sels nutritifs depuis les sacs bruts jusqu'aux fermenteurs

Préparé par : MARZAK meryeme
Encadré par :

- Mr . ALI BENANI (LESAFFRE MAROC)
- Pr .TAHRI JOUTI MOHAMED ALI (FST FES)

Soutenu le : 12 / 06 / 2013

Devant le jury composé de :

- Pr . TAHRI JOUTI MOHAMED ALI (FST FES)
- Pr . SANAE GUISSI (FST FES)
- Mr . ALI BENANI (LESAFFRE MAROC)



Remerciements



*Ce stage de fin d'étude a été effectué à la société LESAFFRE MAROC. Je tiens à exprimer ma gratitude la plus profonde à **Mr. Ali Bennani** chef du laboratoire de la société LESAFFRE MAROC, pour son encadrement, sa collaboration, son soutien continu tout au long de mon stage et surtout pour sa disponibilité et ses directives toujours constructives.*

*A l'issue de ce travail, Je tiens à présenter mes sincères remerciements à **Pr. Tahri Jouti Mohamed Ali** pour son encadrement, sa disponibilité, ses remarques ainsi que ses précieuses orientations.*

*Je remercie également **Pr .Sanae Guissi** d'avoir acceptée d'examiner ce modeste travail.*

Je tiens aussi à remercier tout le personnel du laboratoire d'analyses microbiologiques que j'ai côtoyé, pour son accueil, son soutien et l'aide qu'il a m'apporté dans la réussite de mon stage.

J'adresse mes vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué à la tache de mon travail et ceux qui ont participé de près ou de loin à la réussite de mon stage.

Liste des figures et tableaux

Figure n°1 : Organigramme de la société LESAFFRE MAROC

Figure n°2 : Cellules de levure *Saccaromyces cerevisiae* Microscope optique ×1000

Figure n°3 : Cycle de vie de la levure *Saccharomyce cerevisiae*

Figure n°4 : Schéma général de la fermentation chez la levure

Figure n°5 : Schéma général de production de la levure

Figure n°6 : Schéma de circuit de préparation des sels nutritifs

Figure n°6 : Bac de préparation

Figure n°7 : Filtre

Figure n°8 : Pompe

Figure n°9 : Aspect du milieu de la gélose nutritive glucosé

Figure n°10 : Aspect du milieu au Désoxycholate

Figure n°11 : Aspect du milieu à la lysine

Tableau 1 : Composition type des levures de boulangerie.

Tableau 2 : Procédure du nettoyage

Tableau 3 : La concentration des sels

Tableau 4 : Nombre des colonies aux niveaux des sels en poudre

Tableau 5 : Nombre des colonies dans l'étape de préparation des sels nutritifs au cours du temps

Tableau 6 : Nombre des colonies dans l'étape de stockage des sels nutritifs au cours du temps

Tableau 7 : Nombre des colonies dans l'étape de distribution des sels nutritifs au cours du temps

Liste des abréviations

- MD Mélasse diluée
- MDC Mélasse diluée et clarifiée
- MDCS Mélasse diluée, clarifiée et stérilisée
- Ur Urée
- MAP Phosphate mono ammonium
- Su Sulfate

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
I - Présentation de la société LESAFFRE MAROC.....	2
II - Organigramme.....	3
III- Description du laboratoire d'analyses LESAFFRE MAROC	4
1^{ère} Partie :Généralités sur la levure et procédés de fabrication.....	5
I - Levure.....	6
I . 1 - Définition	6
I . 2 - Taxonomie	6
I . 3 - Caractéristiques structurales.....	7
I . 4 - Modes de reproduction.....	7
I . 5 - Conditions de croissances	8
I . 6 - Métabolisme	8
I . 7 - Composition chimique de la levure	10
I . 8 - Différentes utilisations de la levure	10
II - Les étapes de la production de la levure.....	11
II . 1 - Préparation de la mélasse	11
II . 2 - Ensemencement	12
II . 3 - Préfermentation	12
II . 4 - Fermentation	12
II . 5 - Séparation	13
II . 6 - Filtration	13
II . 7 - Séchage	13
II . 8 - Emballage	14
II . 9 - Conservation.....	14
2^{ème} Partie : Stations de traitement des sels nutritifs	16
I - Sels nutritifs.....	17
I . 1 - Définition.....	17
II - Engrais azotés et phosphatés	17
II . 1 - Engrais azotés.....	17
II . 1 . 1 - Urée	17

II . 1 . 2 - Sulfate d’ammoniaque.....	17
II . 2 - Engrais phosphatés.....	17
II . 2 . 1 - Mono ammonium phosphate	18
III - Différentes étapes du traitement des sels nutritifs	18
3^{ème} Partie : Matériel et Méthodes.....	21
I . Matériel.....	22
1- Bac de préparation des sels.....	22
2 - Filtre	22
3 - Pompe	23
4 - Débitmètre.....	23
II - Plan de nettoyage.....	24
III - Contrôle microbiologique des sels nutritifs.	25
1- Echantillonnage.	25
1.1- Prélèvement	25
2- Analyses microbiologiques	25
2.1 - Recherche des bactéries totales.....	25
2.2 - Recherche des coliformes totaux.....	27
2.3 - Recherche des levures sauvages.....	29
3 -Dénombrement.....	30
4^{ème} Partie : Résultats et discussion.	31
CONCLUSION	37
Référence.....	38

Introduction

Sous le terme générique les micro-organismes, (moisissures, bactéries et levures) sont des êtres vivants microscopiques et ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. Ils sont avant tout indispensables à l'équilibre de la biosphère en participant aux cycles élémentaires de la nature. Ils sont également largement utilisés en biotechnologies ,et c'est avec la production d'aliments fermentés (yaourt, pain) que l'utilisation de micro-organismes a augmenté dans le domaine agroalimentaire soit pour la conservation et c'est le cas de yaourt par l'emploi des ferments lactiques (*lactobacilles* et les *lactococcus*) ou par l'utilisation directe des souches de levures surtout qui appartiennent aux familles des *Saccharomycetaceae* pour la production de la levure de boulangerie ou pour la production de la bière.

Cependant, comme toute industrie agroalimentaire l'industrie de la production de la levure de boulangerie présente des risques de contamination microbiologique qui peuvent concerner les différentes étapes de production .Ceci nécessite la réalisation d'analyses permanentes. Dans ce cadre j'ai eu l'opportunité d'effectuer un stage au sein de la société « LESAFFRE MAROC» spécialisée dans la fabrication de levure de panification et plus précisément au sein du laboratoire d'analyses microbiologiques pour analyser les différentes étapes de préparation des sels nutritifs utilisés comme source d'azote et de phosphate pour la levure depuis les sacs jusqu' aux fermenteurs, cette analyse consiste à la recherche des coliformes totaux, levures sauvages et des bactéries totales.

I - Présentation de la société LESAFFRE MAROC



La société SODERS qui porte aujourd'hui comme nouvelle appellation LESAFFRE MAROC est fondée en 1993.

Le groupe agroalimentaire LESAFFRE MAROC est le leader mondial dans le domaine de la levure de panification. Connaissances approfondies sur la levure ainsi que des compétences pointues en biotechnologies.

L'innovation technique, la maîtrise du savoir-faire, la capacité à proposer des solutions sur-mesure ont contribué à construire le succès de LESAFFRE MAROC. Son aptitude à anticiper les besoins, à comprendre les attentes de ses clients et à fournir des produits de qualité ont imposé le Groupe comme fournisseur incontournable des industriels, et du grand public. Cette société se révélera progressivement comme l'élément moteur et le support de l'essor industriel et commercial de la branche levure du groupe.

A la fin du 19^{ème} siècle, la société affiche déjà une volonté exportatrice à l'Angleterre, la Belgique, la Suisse, l'Italie et Espagne. Ce qui semble tout naturel aujourd'hui représente un tour de force pour l'époque, en raison des conditions de transport et de distribution. Une marque fait son apparition avec un symbole de proximité et de fidélité, « L'hirondelle » qui traversera le temps et l'espace, un logo qui, identifie les produits de la société et se considère comme l'emblème fédérateur du groupe LESAFFRE MAROC dans le monde via ses 35 sites de production et sociétés commerciales et de distribution, afin d'être plus proche de ses clients.

Les marques fabriquées par LESAFFRE MAROC sont :

- Levure sèche : Rafiaa et Nevada
- Levure fraîche : Raouda
- Les améliorants de panification ibis Bleu et Maximin
- Levure destiné pour saturer les besoins des forces armées royales : far

Carte d'identité :

Raison sociale	: LESAFFRE MAROC
Directeur général	: Mr Damien LESAFFRE
Forme juridique	: Société anonyme
Effectifs	: 200 personnes (dont 20 cadres)
Secteur d'activité	: Agroalimentaire
Gamme de produits	: Levures de panification

II .Organigramme

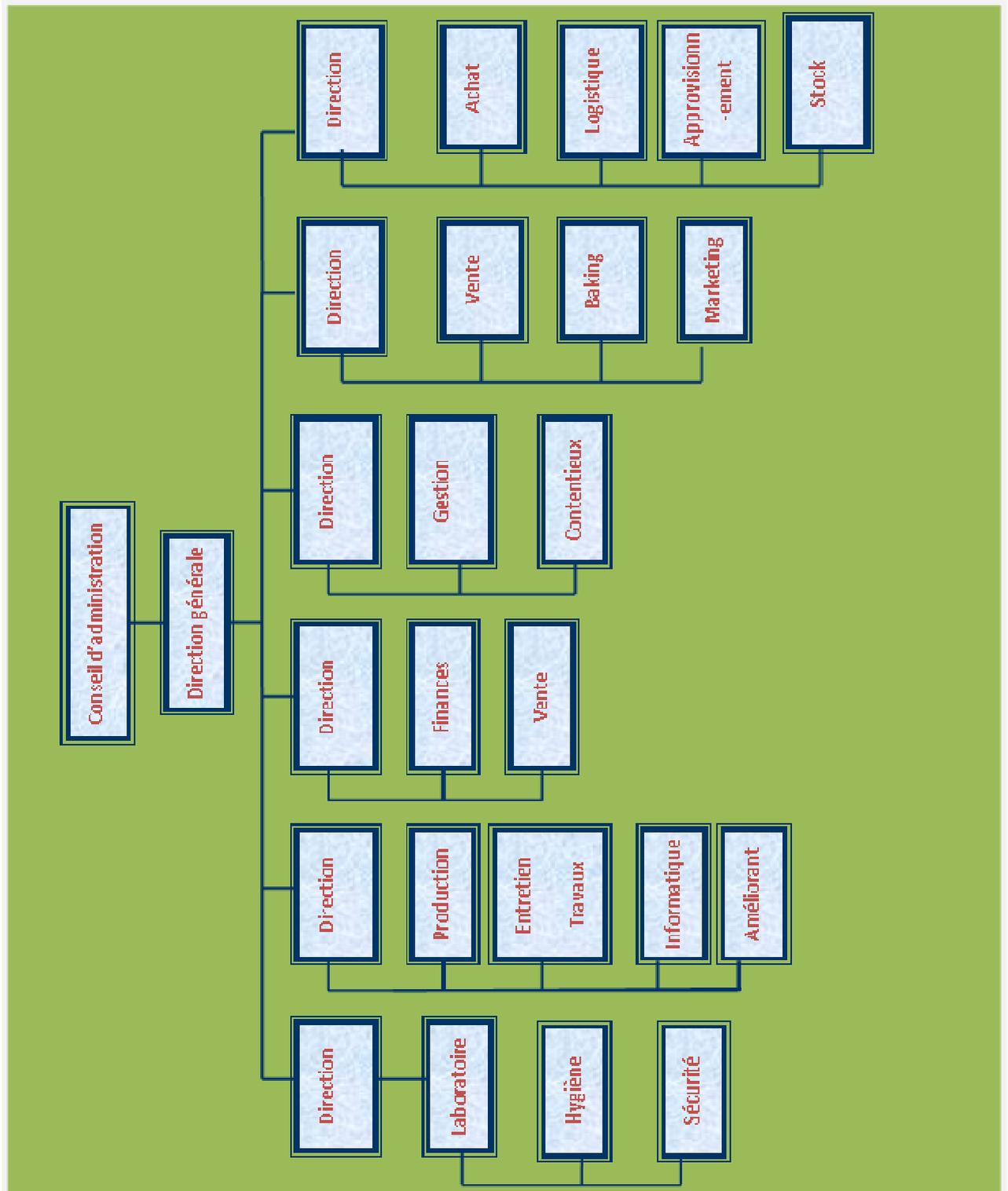


Figure n°1 : Organigramme de la société LESAFFRE MAROC

III - Description du laboratoire d'analyses LESAFFRE MAROC

LESAFFRE MAROC dispose **deux laboratoires, microbiologique et physicochimique** qui sont chargés de faire des analyses le long de la chaîne de production afin d'obtenir un produit fini qui répond à toutes les normes de qualité.

➤ Laboratoire d'analyses microbiologiques

Toutes les conditions de la réalisation des analyses performantes sont réunies. Un matériel suffisant et moderne, des techniques d'identifications des micro-organismes assez rigoureuses imposées par le groupe, un système d'épuration d'air, un personnel hautement qualifié et expérimenté, un climat professionnel, et la veillance d'un chef de laboratoire.

Ce laboratoire est divisé en:

- Une salle d'analyses des germes pathogènes.
- Une salle de préparation des milieux de culture, stérilisation.
- Une salle de stockage du matériel.
- Une salle d'analyses microbiologiques.

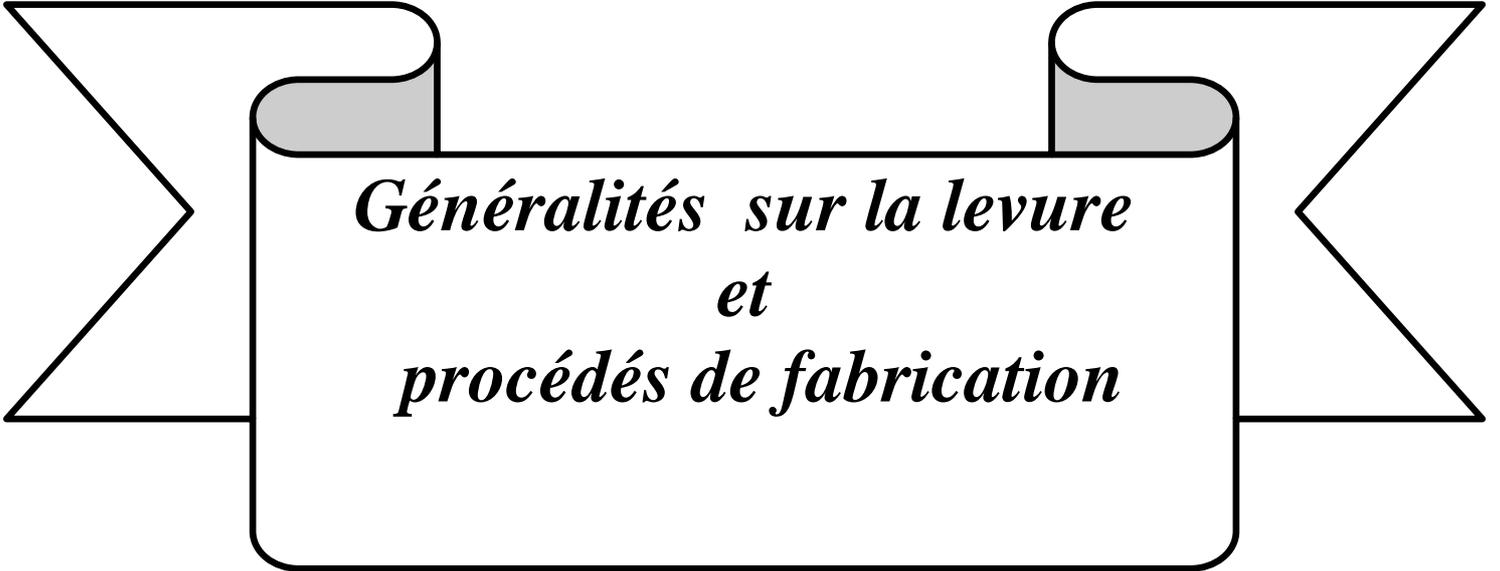
➤ Laboratoire d'analyses physicochimiques

Equipé de matériels sophistiqués, alimenté de différents types d'eaux (eau adoucie, eau distillée, eau de ville) un personnel qualifié y effectue quotidiennement des analyses physicochimiques.

Ce laboratoire est constitué de deux salles :

- Salle d'analyses physicochimiques.
- Salle de stockage du matériel.

1^{ère} Partie



*Généralités sur la levure
et
procédés de fabrication*

I - Levure

I .1 – Définition

La levure est un champignon unicellulaire employée pour la fabrication du vin, de la bière, des alcools industriels, du pain et d'antibiotiques.

Le terme courant de levure désigne généralement le genre *Saccharomyces* levure de bière ou levure de boulangerie.



Figure n° 2 : Cellules de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Microscope optique× 1000)

(Larpent ,1990)

Ces micro-organismes, de forme variable selon l'espèce sphérique, ovoïde, en bouteille, triangulaire mais généralement ovales ; d'environ 6 à 10 microns et jusqu'à 50 microns, se multiplient par bourgeonnement.

I.2 – Taxonomie

✓ Règne	<i>fungi</i>
✓ Division	<i>Ascomyco</i>
✓ Sous-embranchement	<i>Saccharomycotina</i>
✓ Classe	<i>Saccharomycetes</i>
✓ Sous-classe	<i>Saccharomycetidae</i>
✓ Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
✓ Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
✓ Genre	<i>Saccharomyces</i>
✓ Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

(Leclerc H., 1983)

I . 3 – Caractéristiques structurales

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes, Ainsi, elles possèdent les caractéristiques structurales propres à ce type cellulaire et d'autres plus spécifiques aux levures elles-mêmes :

- ❖ **Une paroi cellulaire** : Entourant la membrane plasmique et protégeant La levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur. Elle est constituée d'une couche externe de mannoprotéines, associés à des glucanes et une couche interne de glucanes associés à une petite quantité de chitine.
- ❖ **Une membrane cytoplasmique** : Composée essentiellement de phospholipides double couche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur). Elle contient aussi de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques dont les rôles sont variés.
- ❖ **Un noyau**: Contenant l'information génétique du génome chromosomique de la levure.
- ❖ **Des mitochondries** : Jouant un rôle important dans la respiration aérobie de la levure et la production d'ATP.
- ❖ **Cytoplasme** : Dans lequel s'effectuent les transformations de certains métabolite.
- ❖ **Vacuoles** : Organites à l'aspect homogène, qui servent d'espaces de stockage pour diverses substances.
- ❖ **Chromosomes** : les levures sont des organismes eucaryotes et possèdent un noyau avec des chromosomes linéaires. Chez les *Saccharomyces*, les chromosomes sont au nombre de 16 simples ou paires selon la forme haploïde ou diploïde de la cellule.
- ❖ **Enzymes** : qui assurent les réactions biochimiques

I . 4 – Modes de reproduction

Les modes de reproduction varient en fonction des espèces de levures. Les levures utilisées dans la fabrication de la bière et du pain, les *Saccharomyces cerevisiae*, se reproduisent par bourgeonnement : une petite hernie apparaît en un point de la surface d'une cellule mère, grossit et s'étrangle. Le bourgeon (cellule fille) se détache alors, grossit encore et bourgeonne à son tour.

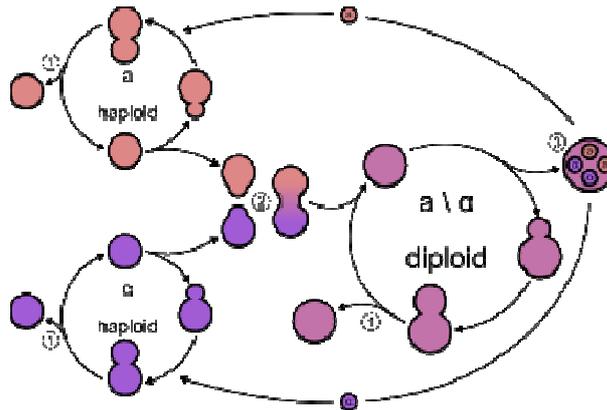


Figure n° 3 : Cycle de vie de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

(Herskowitz ,1988)

I . 5 - Conditions de croissances

Température : La température optimale de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, d'une façon générale, les levures ne sont pas thermorésistantes. La destruction cellulaire commence dès 52°C.

Activité de l'eau : La plupart des souches ne peuvent se développer pour une activité d'eau inférieure à 0,90 ; mais certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées, correspondant à une activité d'ordre de 0,60.

Oxygène : Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levure anaérobie stricte.

pH : Les enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H_3O^+ et OH^- les levures tolèrent donc des gammes de pH très larges, théoriquement de 2,4 à 8,6.

I . 6 – Métabolisme :

Les deux principaux processus énergétiques connus chez les levures sont
La respiration et la fermentation.

A - Respiration :

En aérobiose (en présence d'air), les levures respirent et se multiplient abondamment, sans formation d'alcool. Le sucre dont elles se nourrissent est transformé en gaz carbonique et en eau. Ce phénomène s'accompagne d'une libération importante d'énergie qui leur permet de croître et de se multiplier par bourgeonnement.



B-Fermentation alcoolique

En anaérobiose le sucre est en grande partie transformé en alcool au détriment de l'énergie libérée. C'est le cas de panification. La levure ne trouve plus d'oxygène. le sucre fourni par la farine est transformé en alcool (élevé à la cuisson) et en gaz carbonique. Chez le boulanger, la levée de la pâte résulte de cette production de gaz carbonique et en faible l'énergie est libérée mais en faible quantité. Suffisamment pour vivre mais pas pour se multiplier.

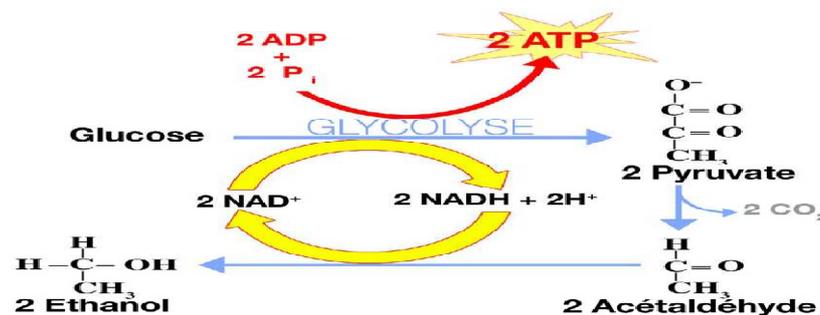


Figure n° 4 : Schéma général de la fermentation alcoolique chez la levure

(SCAFFARIE , 2012)

I.7 - Composition chimique de la levure

La composition type des levures de boulangerie est présentée dans le tableau 1

ci-dessous :

Tableau I : Composition type des levures de boulangerie

Composé (1)	Quantité	Composé (1)	Quantité
Azote	(g/100 g MS)	Vitamines	(mg/100 g)
Total	6 à 9	Thiamine (B1).....	2 à 15
Phosphore en P 205	(g/100 g MS)	Riboflavine (B2).....	2 à 8
Total	1,8 à 3	Pyridoxine (B6).....	0,5 à 6
Sucres.....	(g/100 g MS)	Niacine (PP ou B3)	10 à 60
Total	35 à 45	Acide folique (B9)	1 à 6
Dont : glucanes.....	8 à 12	Acide pantothénique (B5)	5 à 15
mannanes.....	8 à 12	Minéraux.....	(g/100 g MS)
tréhalose.....	10 à 18	Fe	0,005 à 0,100
glycogène.....	1 à 5	Ca.....	0,02 à 0,15
Lipides.....	(g/100 g MS)	Mg.....	0,05 à 0,25
Total	4 à 7	K.....	0,8 à 2,5
Dont : phospholipides	1,5 à 3	Métaux lourds	(ppm/MS)
stérols	0,4 à 0,8	Pb.....	< 0,2
Oligoéléments	(ppm/MS)	Cd.....	< 0,1
Cu	< 10	As.....	< 0,5
Zn	< 150	Hg.....	< 0,05
		Se.....	< 0,5

(1) MS : matière sèche.

I . 8 – Différentes utilisations de la levure

Les levures représentent certainement le groupe le plus important des micro-organismes exploités par l'homme, elles sont utilisées par exemple pour :

- ✓ La fabrication du pain ou des boissons alcoolisées.
- ✓ Affinage des fromages : la levure participe à l'affinage des fromages : en consommant l'acide lactique produit par les bactéries à partir des composants du lait. Elles contribuent à réduire l'acidité du caillé.
- ✓ Production des protéines : car les levures ont une forte valeur nutritive.
- ✓ Biologie moléculaire : afin d'étudier les métabolismes cellulaires.
- ✓ Les levures sont aussi utilisées comme source de vitamine B thiamine.

II - Les étapes de la production de la levure

II . 1 - Préparation de la mélasse

La mélasse présente pour la levure une source de carbone, sa préparation (75% betterave + 25% canne) consiste en une dilution, décantation ; clarification et stérilisation.

II .1 .1 - Dilution de la mélasse

La mélasse brute de la canne de la betterave provient des tanks et se mélange dans une cuve de dilution (MD) avec de l'eau et de la vapeur.

La mélasse brute à diluer contient environ 80% de betterave et 20% de canne. Quand à la dilution, elle est d'environ 50%.

La température dans la cuve de MD est de 70°C Grâce à l'eau chaude ajoutée (66°C) et la vapeur injectée (3 ,5 bar) diminue la viscosité de la mélasse.

II .1 .2 - Clarification

La mélasse diluée passe dans un clarificateur où elle est centrifugée.

Cette étape consiste à éliminer les colloïdes et boues et d'éviter ainsi le colmatage des échangeurs utilisés pendant la stérilisation.

II .1 .3 - Stérilisation

La mélasse diluée et clarifiée (MDC) est stérilisée par injection de vapeur d'eau dont la température est supérieur à 120°C ce qui provoque la dénaturation des protéines des microorganismes et la mort de ces derniers.

Cette technique consiste en un contact direct de la vapeur d'eau et la matière à stérilisé pendant 2 à 3 min selon le débit de la mélasse et à une pression convenable, ensuite.Elle passe dans un échangeur à plaque « MDCS» afin d'être refroidie.

II. 1 .4 - Stockage de MDCS

Après la stérilisation, la mélasse est gardée à 90 °C dans deux cuves MDCS.

II. 1 .5 - Refroidissement

Avant d'être introduite dans les fermenteurs, la MDCS passe dans des refroidisseurs à contre courant, qui sont des échangeurs à plaques mélasse / eau froide, la mélasse se refroidie et l'eau se réchauffe.

II . 2 - Ensemencement

Chaque mois la société reçoit de la France. 2 souches de *saccharomyces cerevisiae*.

La première est destinée à la levure fraîche et l'autre à la levure sèche. Ces souches sontensemencées dans des tubes avec un milieu nutritif spécifique à la croissance des levures. Cette étape exige un travail dans des conditions strictement aseptiques pour écarter tout risque de contamination, puis le contenu des tubes est transvasé dans un petit ballon appelé « Van Lear » dont le milieu nutritif très riche favorise une première multiplication des cellules. Le contenu du « Van Lear » est versé ensuite dans un ballon plus grand appelé « Carlsberg» où elles se multiplient à nouveau.

II . 3 - Préfermentation

Le contenu de 800 litres est versé dans un préfermenteur auquel les ingrédients suivant sont ajoutés avec des quantités précises :

- Eau
- Mélasse stérile
- Sels minéraux
- Eléments de traces (Oglio – éléments et vitamines)
- Air

II . 4 - Fermentation

A la fin de préfermentation, on obtient un mout qui servira à ensemer le fermenteur avec un milieu nutritif bien spécifique et après 14 à 16 heures de fermentation, la levure mère ; va subir une étape de séparation puis un stockage à +4 °C.

La levure mère obtenue va aussi servir à la fermentation, par ensemencement partiel pour donner naissance à une levure commerciale.

II. 5 - Séparation

La séparation se fait en deux étapes de la fermentation : après l'obtention de la levure mère et la levure commerciale. Le moût obtenu à la sortie des fermenteurs contient les cellules de levures et une solution liquide qui présente les restes du milieu nutritif.

Pour éliminer les déchets on utilise un séparateur qui utilise comme principe la centrifugation, on obtient alors un liquide dense (crème) et un liquide léger, c'est le moût déloverai.

La crème obtenue après la séparation est acidifiée par l'acide sulfurique à pH= 2 pour éviter la contamination ; et elle est stockée à 4° C pour ralentir le métabolisme cellulaire.

II .6 - Filtration

Consiste à éliminer l'eau présente dans « la levure » pour la préserver d'une éventuelle contamination puisque l'eau facilite l'altération par des microorganismes.

La crème arrive au niveau d'un filtre rotatif qui contient une couche d'amidon, le but étant de ne laisse pénétrer que l'eau.

La crème est étalée sur la surface de filtre et récupérée sous forme de levure râpée.

II . 7- Séchage

On distingue 2 types de levure :

II . 7 - 1 La levure sèche active ou SPH

Sous forme de petits grains sphériques, sa durée de séchage est d'environ quatre heures pour une qualité de 400 Kg à 500 kg. Elle s'effectue à 45°C.

Elle est séchée de manière à obtenir 93 à 94% de matière sèche. Ce type de levures sèches nécessite une phase de réhydratation avant son utilisation. Elle est emballée sous air.

II . 7 - 2 La levure sèche instantanée ou SPI

Sous forme des bâtonnets, elle a une durée de séchage réduite, 20 min environ pour une quantité de 1000 Kg, elle est caractérisée par une force fermentaire sèche. Ce type de levure

sèche ne nécessite aucune phase de réhydratation avant son utilisation. Elle est emballée sous vide ou sous azote.

II . 8 - Emballage

II . 8 - 1 Emballage de la levure fraîche

S'effectue grâce à une machine spéciale, constituée d'une boudineuse, découpeuse et enveloppeuse. Quand le gâteau de la levure fraîche passe par cette machine, on aura à la fin un produit fini sous forme de paquets ayant un poids net de 500g, qu'on met en cartons disposés sur des palettes de manière à avoir un espace entre eux pour faciliter la circulation d'air froid.

II . 8 - 2 Conditionnement des levures sèches

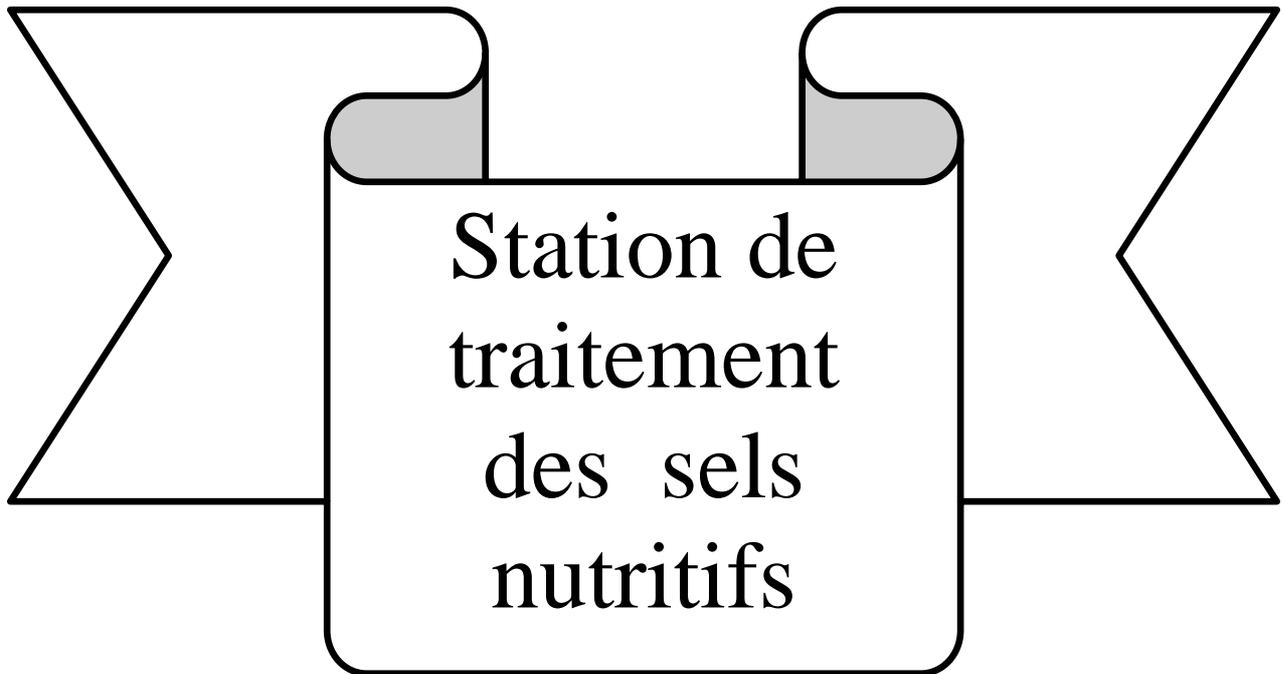
Après séchage ; la levure passe dans un appareil de conditionnement spécifique qui aspire l'air des paquets pour une conservation à longue durée.

II . 9 - Conservation

La levure fraîche est conservée à 4°C, alors que la levure sèche est conservée à température ambiante.

➤ La figure n°5 résume l'ensemble des étapes de la chaîne de production .

2^{ème} Partie



I - Sels nutritifs

I .1 – Définition

Les sels nutritifs sont des engrais azotés et phosphatés utilisés pour répondre aux exigences nutritionnelles imposées par la croissance et la multiplication des cellules de la levure. L'apport azoté et phosphaté de mélasse est insuffisant pour couvrir les besoins de la levure, l'ajout d'azote et de phosphate dans les fermenteurs se fait habituellement sous forme de sels d'ammoniums (NH_3) et sous forme d'acide phosphorique (H_3PO_4)

II - Engrais azotés et phosphatés

II . 1 - Engrais azotés

II .1 . 1 - Urée

La levure peut utiliser des sources différentes telles les acides aminés, les peptides, les bases simples. Mais l'azote sous forme d'ion ammonium est plus facilement assimilable. Il est transporté de façon passive et incorporé par transamination après une réaction de fixation sur le glutamate qui nécessite une hydrolyse d'ATP.

L'urée utilisé se présente sous forme de poudre cristalline blanche, de formule chimique $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, conservé dans des sacs de 50 kg, sans odeur, et soluble dans l'eau .Il contient 21% d'azote.

II . 1 . 2 - Sulfate d'ammoniaque

Le sulfate d'ammoniaque de formule chimique $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sous forme de poudre cristalline blanche, conservé dans des sacs de 50 kg, sans odeur, et soluble dans l'eau. Se compose de 21% d'azote (sous forme d'ammonium) et 24% de soufre (Sous forme de sulfate).

Le sulfate est nécessaire pour la synthèse de protéines essentielles pour la multiplication cellulaire et le transfert des sucres de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule.

II . 2 - Engrais phosphatés

II.2.1 Mono ammonium phosphate

Le MAP, est un composé chimique de formule $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Il s'agit d'un sel d'ammoniac NH_3 et d'acide phosphorique H_3PO_4 , constitué de cations ammonium NH_4^+ et d'anions dihydrogénophosphate H_2PO_4^- . Il se forme à l'état de poudre cristalline lorsqu'on mélange deux solutions d'ammoniac et d'acide phosphorique, en même temps que le phosphate d'ammonium $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ et MAP $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ en fonction de la concentration relative en ammoniac et en acide phosphorique ; il apparaît dès que la solution devient acide .



Le phosphate mono-ammonium comprend 12% de NH_3 et 61% de PO_4

Le MAP est utilisée comme source d'azote et phosphate nécessaire dans la synthèse des acides nucléiques, les protéines, les phospholipides, l'ATP, les coenzymes (NADP).

LESAFFRE MAROC utilise le MAP sous forme de cristaux, conservé dans des sacs de 25kg, sans odeur, et soluble dans l'eau.

III - Différentes étapes du traitement des sels nutritifs :

1 - Dilution et désinfection

Dans la station de préparation il existe un seul bac pour la préparation des trois sels . Le matin est réservé pour préparer l'urée, d'après midi, le sulfate et en fin le soir le phosphate mono ammonium.

Les sels sont évacuées dans une cuve munie d'un agitateur afin d'accélérer la solubilisation des sels et d'un **filtre** afin d'éliminer les impuretés qui sont remplies d'eau désinfectée avec de l'eau de javel (**chloration**)

Afin d'obtenir la concentration souhaitée dans chaque cuve de préparation, les normes caractérisées par le volume d'eau et la quantité des sels évacuée doivent être respectés.

Tableau n° 2: Concentration des sels nutritifs

	Capacité de bac	Nombre de sacs	Volume d'eau (L)	Densité	Eau de javel (L)
Urée	25m ³	45 de 50 kg	1000	1,05	1
MAP	15 m ³	50 de 25 kg	10800	1,055	1
Sulfate	7m ³	25de 50kg	6000	1 ,095	0,5

La chloration est l'action de désinfecter avec des produits chlorés (eau de javel). Ce composé contient des atomes de chlore, qui a des propriétés rémanentes, ce qui signifie que son action désinfectante est valable sur tout le long des préparations des sels.

2 - Stockage

Le mélange préparé dans la station de préparation est pompé vers la station de stockage contenant pour chaque type de sel deux cuves munis d'une pompe.

3 - Distribution

Les cuves se trouvant dans la salle de stockage sont connectées aux fermenteurs pour leur alimentation. Le contrôle de la quantité des sels qui passent dans les fermenteurs se fait à l'aide des débitmètres.

➤ La figure n°6 résume les étapes de préparation des sels nutritifs.

Cuve avec agitation

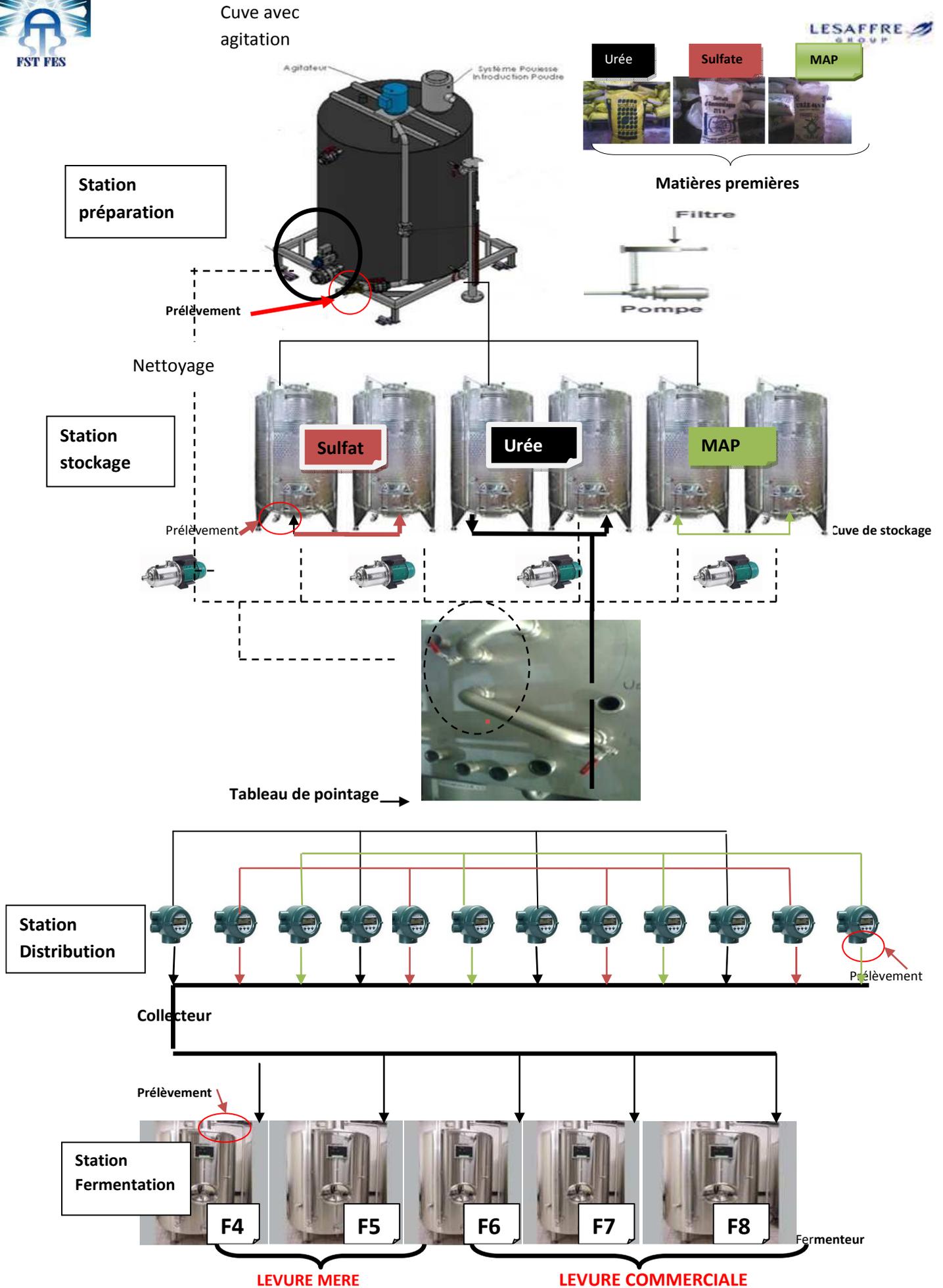
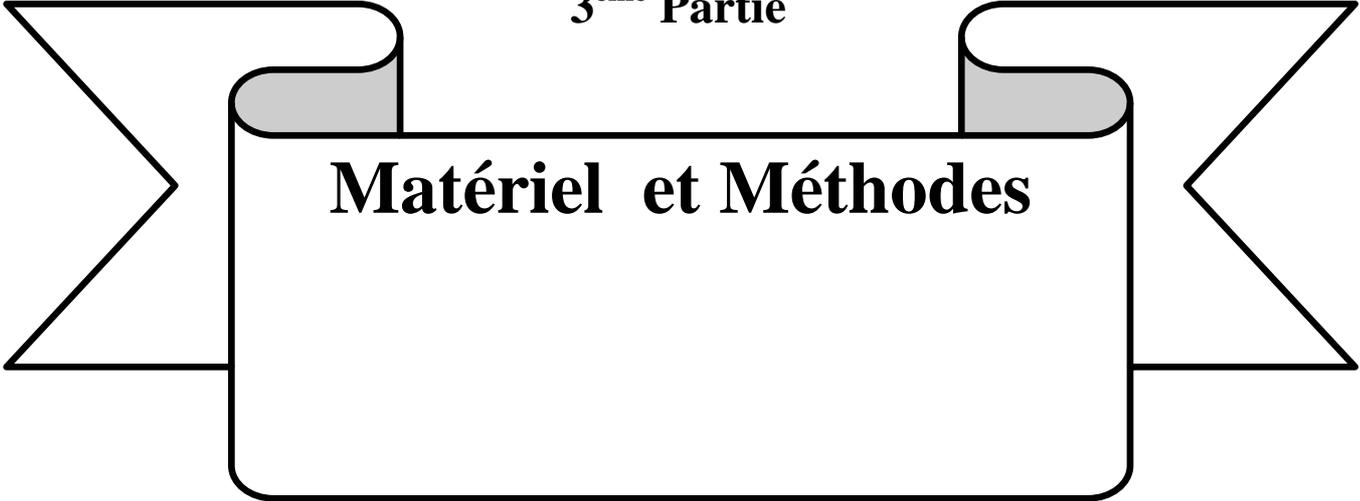


Figure n 6° : Schéma du circuit de préparation des sels nutritifs

3^{ème} Partie



Matériel et Méthodes

I – Matériel :

1 - Bac de préparation :

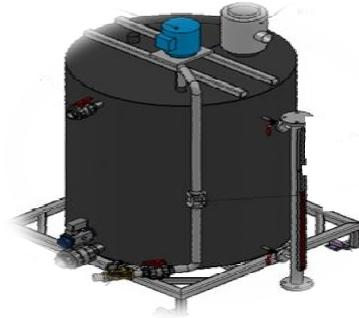


Figure n°7 : Bac de préparation des sels

Le bac de préparation des sels se compose :

- D'une cuve isolée de type inox (anticorrosion),
- D'une cuve intérieure présentant une bonne conductibilité solide, indéformable (matériaux inoxydables),
- D'un agitateur assurant la solubilisation des sels dans l'eau,
- Sa forme et notamment son fond est conçu de façon que l'écoulement des liquides par la vanne de vidange disposée en un point bas se fasse complètement et rapidement.

2 - Filtre



Figure n°8 : Filtre

Avant de transférer la solution vers la cuve de stockage, elle traverse un filtre qui contient des pores très fins dans le but d'éliminer les impuretés.

Le but de la filtration est de séparer les constituants d'un mélange liquide - solide par passage à travers un milieu filtrant. Lors du passage d'une suspension à travers un milieu filtrant, le fluide circule à travers les ouvertures tandis que les particules sont arrêtées.

Il se présente sous la forme d'un cylindre Composé de plusieurs trous, disposant un couvercle amovible permettant d'accéder à l'élément filtrant.

3 - Pompe



Figure n°9 : Pompe

Une pompe est un dispositif permettant d'aspirer et de refouler un fluide.

Les pompes se divisent en deux catégories principales :

- **Les pompes centrifuges** : le mouvement du liquide résulte de l'accroissement d'énergie qui lui est communiqué par la force centrifuge. C'est le type utilisé chez la société LESAFFRE Maroc.
- **les pompes volumétriques** : l'écoulement résulte de la variation d'une capacité occupée par le liquide.

4 - Débitmètre

Un débitmètre est un appareil destiné à mesurer le débit d'un fluide (liquide ou gazeux).

II - Plan de nettoyage

Le plan de nettoyage se fait quatre fois par semaine et de manière séparée d'une part et d'autre part que le nettoyage se fait trois fois par la soude qui joue le rôle de désinfectant et nettoyant, et l'ajout de l'acide nitrique la quatrième fois pour éviter l'accumulation du calcaire, le tableau 3 ci-dessous présente le plan de nettoyage.

Tableau n° 3 : Procédure de nettoyage

	Lundi	Mardi	Mercredi	Jeudi	Vendredi	Samedi	Dimanche
Bac de préparation	Soude + acide nitrique		Soude		Soude		Soude
Cuve de stockage Urée n° 1		Soude + acide nitrique		Soude		Soude	
Cuve de stockage Urée n° 2	Soude		Soude + acide nitrique		Soude		Soude
Cuve de stockage Sulfate n° 1		Soude		Soude + acide nitrique		Soude	
Cuve de stockage Sulfate n° 2	Soude		Soude		Soude + acide nitrique		Soude
Cuve de stockage MAP n° 1		Soude		Soude		Soude + acide nitrique	
Cuve de stockage MAP n° 2	Soude		Soude		Soude		Soude + acide nitrique
Circuit refoulement vers stockage		Soude + acide nitrique		Soude		Soude	
Circuit de consommation des sels	Soude		Soude + acide nitrique		Soude		Soude

III - Contrôle microbiologique des sels nutritifs.

Après l'acquisition des principales informations sur la chaîne de préparation ont été intégrées dans l'équipe du laboratoire microbiologique afin de réaliser des analyses microbiologique de la préparation des sels nutritifs ont été réalisées pour évaluer les risques de contamination des sels préparés dans les bacs. Ces derniers peuvent être l'objet d'une contamination proprement du processus de nettoyage ou de leur contact direct avec l'air.

1 -Echantillonnage

Afin de vérifier si les sels nutritifs répondant aux normes comme une source de nutriments pour la production des levures des échantillons ont été prélevés à chaque étape de la préparation des sels nutritifs.

1.1 - Prélèvement

➤ Matériel utilisé

- Pissette contenant l'alcool
- Flacons stériles

➤ Protocole suivi

- Rinçage des robinets des cuves où se trouvent les sels avec l'alcool.
- Ouverture des robinets pour l'écoulement des sels avant le prélèvement.
- Prélèvement des sels nutritifs dans un flacon stérile.
- Fermeture des robinets et leur désinfection avec l'alcool.

1.2 - Echantillons prélevés

Pour nos analyses des échantillons ont été prélevés à partir de différentes étapes de préparation des sels nutritifs :

- Les sels en poudre
- Les sels nutritifs (urée, sulfate, phosphate) : à partir de la salle de préparation, de la station stockage et de la station de collections.

2 - Analyse microbiologique

2.1 - Recherche des bactéries totales

2.1.1 Définition

Les bactéries totales ou la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Format une Colonie) présent dans un produit ou sur une surface. Ce dénombrement se fait à 30 °C.

Comme il s'agit d'un milieu ordinaire, la plupart des micro-organismes peuvent se développer, sauf ceux qui sont exigeants et les micro-organismes anaérobies stricts.

Il est donc préférable de parler de Flore Mésophile Aérobie à 30°C que de « flore totale ».

L'unité est l'UFC (Unité Format Colonie) car une colonie observable sur la gélose peut venir d'un micro-organisme isolé, d'une spore ou encore d'une association de micro-organismes.

(Leclerc H, 1983).

2.1.2 - Milieu de culture

La gélose nutritive glucosé est un milieu utilisé pour le dénombrement des microorganismes aérobies aussi nommé FMAT .Il s'agit d'un milieu ordinaire, avec inhibiteurs, le but étant de compter l'ensemble des bactéries capable de croître à 30°C présentes dans un produit ou sur une surface

Ce milieu est composé de :

- Peptone : 5 g /l
- Extrait de levure : 2,5 g /l
- Glucose : 1 g /l
- Agar : 15 g /l

pH =7



Figure n°9 : Aspect du milieu de La gélose nutritive glucosé

(Guillaume , 2004)

2 . 1 . 3 - Ensemencement

L'ensemencement consiste à :

- Débarrasser la paillasse et la désinfecter avec de l'eau de javel.
- Régler le bec benzène pour avoir une flamme bleue et la manipulation doit être réalisée près de la flamme pour avoir un travail avec des conditions aseptiques.

- Prendre le flacon de l'échantillon dans la main gauche, ouvrir dans la zone stérile, garder le bouchon dans la main droite, et flamber l'ouverture du flacon.
- Prendre une pipette, la flamber et prélever 1 ml de l'échantillon.
- Déposer le flacon et prendre une boîte de pétrie stérile, l'ouvrir près de la flamme et déposer l'échantillon.
- Verser la gélose nutritive glucosé dans la boîte de pétrie, mélanger rapidement en faisant des mouvements circulaires.

2 . 1 . 4 - Incubation et lecture des résultats

Les boîtes sont incubées à 37°C, et après 72h le nombre de colonies est compté dans chaque boîte.

2 . 2 - Recherche des coliformes totaux :

2 . 2 . 1 - Définition

Les coliformes totaux sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau, parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Les coliformes totaux sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou anaérobies facultatives. Les principaux genres inclus dans le groupe sont : Citrobacter, Entérobactérie, Escherichia, Klebsiella et Serratia. La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent pas de risque direct pour la santé.

On trouve aussi les coliformes totaux (à 30 °C), on distingue les coliformes thermo tolérants (fécaux) qui fermentent le lactose à 44 °C.

Les coliformes sont recherchés dans les aliments car ils sont de bons marqueurs de l'hygiène des manipulations de ces aliments. Ils sont d'origine fécale on les retrouve donc dans les eaux usées et le sol.

(Nova Scotia /Canada à 2010)

2 . 2 . 2 - Milieu de culture

Pour les coliformes, le milieu qui est utilisé à Lesaffre Maroc est la gélose de Désoxycholate.

Ce milieu :

- ✓ Un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des bactéries coliformes dans les eaux, le lait, le produit laitier.
- ✓ Employé aussi pour la différenciation et l'isolement des entérobactéries à partir des prélèvements biologiques.

✓ Composé de :

- Peptone pepsique de viande : 10 g/l
 - Citrate de sodium : 1 g/l
 - Lactose : 10 g/l
 - Rouge neutre : 0,03 g/l
 - Désoxycholate de sodium : 1 g/l
 - Chlorure de sodium : 5 g/l
 - Hydrogénophosphate de potassium : 2 g/l
 - Agar : 13 g/l
- pH = 7,3

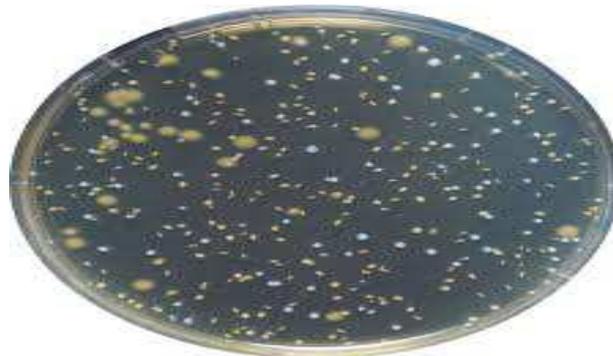


Figure n°10 : Aspect du milieu au Désoxycholate.
(Guillaume 2004)

2 . 2 . 3 – Ensemencement

L'ensemencement consiste à :

- Débarrasser la paillasse et la désinfecter avec de l'eau de javel.
- Régler le bec benzène pour avoir une flamme bleue et la manipulation doit être réalisée près de la flamme pour avoir un travail avec des conditions aseptiques.
- Prendre le flacon de l'échantillon dans la main gauche, ouvrir dans la zone stérile, garder le bouchon dans la main droite, et flamber l'ouverture du flacon.
- Prendre une pipette, la flamber et prélever 1 ml de l'échantillon.
- Déposer le flacon et prendre une boîte de pétrie stérile, l'ouvrir près de la flamme et déposer l'échantillon.
- Verser la gélose de la Désoxycholate dans la boîte de pétrie, mélanger rapidement en faisant des mouvements circulaires.

2 . 2 . 4 - Incubation et lecture des résultats

Les boîtes sont incubées à 30°C, après 24h le nombre de colonies est compté dans les boîtes.

2.3 - Recherche des levures sauvages

2.3.1 Définition

Il s'agit d'un type de levures à forme allongée, ne participent pas à la fermentation et causent différents problèmes sanitaires et influençant sur la qualité de levure *Saccharomyces cerevisiae* (force, conservations).

2.3.2 - Milieu de culture

La lysine est la dénomination donnée à ce milieu de culture. Son nom découle de sa composition, enrichie en fer et en lysine. Il sert à mettre en évidence les bactéries fermentant le glucose.

Composé de :

- Peptone de gélatine : 5 g
 - Extrait de levure : 3g
 - L-lysine : 10 g
 - Glucose : 1 g
 - Citrate de fer III ammoniacal : 0,5 g
 - Bromocrésol pourpre : 20 mg
 - Thiosulfate de sodium : 40 mg
 - Agar : 13,5 g
- pH = 6,7



Figure n°11 : Aspect du milieu à la lysine

(Guillaume 2004)

2.3.3 - Ensemencement

L'ensemencement consiste à :

- Débarrasser la paillasse et la désinfecter avec de l'eau de javel.

- Régler le bec benzène pour avoir une flamme bleue et la manipulation doit être réalisée près de la flamme pour travailler avec des conditions aseptiques.
- Prendre le flacon de l'échantillon dans la main gauche, ouvrir dans la zone stérile, garder le bouchon dans la main droite, et flamber l'ouverture du flacon.
- Prendre une pipette, la flamber et prélever 1 ml de l'échantillon.
- Déposer le flacon et prendre une boîte de pétrie stérile, l'ouvrir près de la flamme et déposer l'échantillon.
- Verser la gélose de lysine dans la boîte de pétrie, mélanger rapidement en faisant des mouvements circulaires.

2. 3. 4 - Incubation et lecture des résultats

Les boîtes sont incubées à 30°C, après 72h le nombre de colonies est compté dans les boîtes.

3 - Dénombrement

Pour l'isolement des bactéries totales, de la levure sauvage et des coliformes totaux, on ensemence 1mL de l'échantillon dans une boîte de pétri tout en respectant les conditions d'asepsie. Un milieu de culture spécifique préalablement préparé et stérilisé, est ajouté la boîte est incubée à une température déterminée du germe recherché.

Remarque : les photos présentées au niveau de ce rapport ne représentent pas celles affichées au laboratoire car il est interdit de prendre des photos à cette société.

4^{ème} Partie

*Résultats et
discussion*

1- Sels en poudre

Le tableau 4 présente le nombre de colonies au niveau des sacs bruts :

Tableau 4 : Nombre de colonies au niveau des sels en poudre

Germes Sels	Levures sauvages	Bactéries totales	Coliformes totaux
Urée	0	0	0
Sulfate	0	0	0
MAP	0	3	0

❖ **Interprétation :**

D'après les résultats on observe l'absence des germes recherchés mais cela n'empêche pas la présence de certaines contaminations qui peuvent être dues à une mauvaise manipulation.

2 - Station de Préparation

Les résultats concernant la station de préparation sont indiqués dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Nombre des colonies dans l'étape de préparation des sels nutritifs au cours du temps

Station prélèvement	Préparation											
	Germes	Levures sauvages				Bactéries totales				Coliformes totaux		
Sels Date	Urée	Sulfate	MAP	Eau+ javel	Urée	Sulfate	MAP	Eau+ Javel	Urée	Sulfate	MAP	Eau+ Javel
12/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29/04/2013	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
30/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

❖ Interprétation

Les résultats montrent l'absence totale de contamination. Ceci peut être expliqué par le suivi rigoureux de la préparation des sels par les responsables qui utilisent l'eau de javel comme désinfectant.

3 - Station de Stockage

Les résultats obtenus au niveau de la station stockage sont indiqués dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Nombre des colonies dans l'étape de stockage des sels nutritifs au cours du temps

Station Prélèvement	Stockage																		
	Levures sauvages						Bactéries totales						Coliformes totaux						
Germes	Ur		Su		MAP		Ur		Su		MAP		Ur		Su		MAP		
Sels Date	A*	D*	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	
12/04/2013	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22/04/2013	0	0	0	0	0	0	7	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23/04/2013	0	0	0	0	0	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24/04/2013	0	2	0	1	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25/04/2013	0	0	0	0	0	0	4	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*A : Assimilation

*D : Décantation

❖ Interprétation

La plupart des résultats montrent l'absence complète des germes mais on remarque qu'il y a présence de certaines bactéries totales du 22 à 25 Avril et certaines levures sauvages le 24 avril, ce qui peut être dû à un mauvais nettoyage ou bien à une manipulation peu hygiénique.

4 - Station de Distribution

Les résultats obtenus au niveau de la station stockage sont indiqués dans le tableau 7 :

Tableau 7 : Nombre des colonies dans l'étape de distribution des sels nutritifs au cours du temps

Station Prélèvement	Distribution								
Germes	Levures sauvages			Bactéries totales			Coliformes totaux		
Sels Date	Urée	Sulfate	MAP	Urée	Sulfate	MAP	Urée	Sulfate	MAP
12/04/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22/04/2013	0	0	0	0	2	0	0	0	0
23/04/2013	0	0	0	20	0	0	0	0	0
24/04/2013	2	0	0	5	0	0	0	0	0
25/04/2013	0	0	0	5	0	2	0	0	0
26/04/2013	0	0	0	1	0	0	0	0	0
29/04/2013	0	0	0	8	0	0	0	0	0
30/04/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3/05/2013	0	0	0	0	0	0	0	0	0

❖ Interprétation :

Egalement la plupart des résultats montrent l'absence complète des germes mais on remarque qu'il y a présence de certaines bactéries totales du 23 à 29 Avril et certaines

levures sauvages le 24 avril, ce qui peut être du de trois facteurs d'une mauvaise manipulation, mauvais nettoyage ou mauvais prélèvement

Remarque : La plage normale de comptage du colonie entre 30 et 300 colonies.

❖ **Commentaire :**

La présence du germe résultant d'une mauvaise manipulation, mauvais nettoyage ou mauvais prélèvement

❖ **Conclusion :**

D'après les analyses microbiologiques effectuées durant les différentes étapes de la préparation des sels nutritifs au sein du laboratoire les résultats suivants ont été obtenus.

Le plan de contrôle des sels nutritifs se fait correctement et l'absence incomplète des germes dans les sels préparés reflète une conformité au niveau des règles d'hygiènes tracés par les responsables des sels et le respect de 7M (Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matériel, Matière ; Monnaie et Management)

Conclusion

D'après les résultats obtenus au sein du laboratoire des analyses microbiologiques les conclusions suivants peuvent être tirées :

- L'absence de contamination reflète le suivi rigoureux de la part des responsable

depuis la station de préparation jusqu'à la station de distribution des sels Nutritifs.

- La contamination trouvée au niveau de certaines stations peut être due à
 - Un mauvais prélèvement
 - Une mauvaise manipulation
 - Un mauvais nettoyage

Mon stage au sein de la société LESAFFRE MAROC présente une véritable expérience professionnelle qui m'a permis de :

- Maitriser les méthodes de manipulation
- Avoir des contacts soit avec le personnel de laboratoire ou avec les autres stagiaires
- Avoir une expérience et une approche avec le travail et le monde industriel pour pouvoir bien s'y intégrer dans l'avenir.
- Appliquer les connaissances théoriques et pratiques acquises à la FST dans le cadre d'une entreprise.

Référence

Guillaume P.Y. 2004 .La microbiologie.

Herskowitz .1988. La microbiologie

Larpen 1990 .Biotechnologie de levure

Leclerc H, Ohussn M. (1983).Microbiologie générale. Edition, Paris

Nova Scotia canada 2010

Scaffarie 2012 . Biologie univ (svtmarcq.blogspot.com)