



Année Universitaire : 2015-2016

**Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives**



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Mise en place d'une nouvelle méthode d'identification des
mélasses toxiques**

Présenté par:

FERRAA Nouhaila

Encadré par:

- | | |
|-----------------------|--|
| - Pr A. BOUKIR | Faculté Des Sciences et Techniques Fès |
| - BOUQUADIDA Abdelali | Lesaffre Maroc |

Soutenu Le 15 Juin 2016 devant le jury composé de:

- | | |
|---------------------------|--|
| - Pr A. BOUKIR | Faculté Des Sciences et Techniques Fès |
| - Pr OUZZANI CHAHDI Fouad | Faculté Des Sciences et Techniques Fès |
| - Pr CHAKROUNE Said | Faculté Des Sciences et Techniques Fès |
| - Mr. BOUQUADIDA Abdelali | Lesaffre Maroc |

Stage effectué à : Lesaffre Maroc



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques



Nom et prénom: FERRAA Nouhaila

Année Universitaire : 2015/2016

Titre: La mise en place d'une nouvelle méthode d'identification des mélasses toxiques

Résumé

Ce projet de fin d'études effectué du 15^{er} février au 15 juin 2016 a été motivé par le besoin d'approfondir mes connaissances dans le domaine de la levurière, lequel séculaire certes mais en perpétuelle évolution avec les biotechnologies. Ceci s'est tenu dans l'entreprise LESAFFRE-MAROC leader mondial de fabrication de levures de boulangerie et d'améliorants de panification.

Profitant de leur expertise et dans un souci de gain de temps, j'ai soumis le sujet intitulé : MISE EN PLACE D'UNE NOUVELLE METHODE D'IDENTIFICATION DES MELASSES TOXIQUES au service laboratoire en charge de mon stage.

Pendant toute la période de stage, le travail a été séquencé en trois parties, la première concerne tout d'abord l'élaboration du mode opératoire approprié à la nouvelle méthode de contrôle de toxicité, ensuite la détermination des nouvelles limites de toxicité par ce même mode opératoire par ajout du cycloheximide à la mélasse et en s'appuyant sur la méthode de toxicité classique. Quant à la deuxième partie, elle représente une étude basée sur la détection des ions ammoniums quaternaires grâce à diverses études effectuées sur les différents détergents utilisés au sein de la société et afin de déterminer le moins toxique d'entre eux. La dernière partie traite l'influence de quelques inhibiteurs sur le fonctionnement de l'invertase, enzyme synthétisée par la levure, qui à pour rôle la dégradation du saccharose en sucres simples (glucose et fructose) assimilables par la levure.

Mots clés: mélasse, saccharose, levure, toxicité, méthode Fermento, ammoniums quaternaires



Memory graduation for obtaining the Diploma of Master Sciences and Techniques



First and Last name: FERRAA Nouhaila

Year: 2015/2016

Title: IMPLEMENTATION OF A NEW METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF TOXIC TREACLE

Abstract

This master's degree project, carried out during the period between the 15th February and 15th June, 2016, is motivated by the necessity to consolidate my knowledge in the yeast domain, which is certainly ancient but in an ongoing evolution with biotechnologies. This occurs in the company LESAFFRE-MOROCCO, leader mondial in the fabrication of bread-yeast and improvement of bread production.

For the sake of making use of their expertise and in the interests of saving time, I submitted the topic entitled: IMPLEMENTATION OF A NEW METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF TOXIC TREACLE in the laboratory service I am interning at.

During my entire internship period, the work was divided into three main parts, the first one concerns itself with the development of the operating modes peculiar to the new method of toxicity control, then the identification of the new toxicity limits with the aid of this very operating mode, adding Cycloheximide to the treacle and relying on the classical method of toxicity, As for the second part, it depicts a study grounded on the detection of ions of quaternary ammoniums, thanks to various studies carried out on the different detergents used in the company so as to determine which of them is the most toxic .The last part deals with the influence of some inhibitors on the functioning of "Invertase", an enzyme synthesized by the yeast , which serves for the degradation of Sucrose to simple Sugars (glucose and fructose) assimilable by the yeast.

Key words : treacle, sucrose, yeast, toxicity, fermento method, quaternary ammonium

Dédicaces

A mes chers parents que tous mes mots, tous les mots, ne sauront décrire les nobles sacrifices consentis pour mon éducation et ma réussite. Je prie DIEU de vous procurer santé, bonheur et longue vie.

A mes sœurs Jihane et Chaimae vous, qui êtes à mes côtés, pour partager mes joies. Je vous souhaite une vie comblée et toute réussite. C'est avec fierté que je vous dédie ce manuscrit.

A toute la promotion MST Chimie Des Molécules Bioactives 2015/2016, je vous souhaite une bonne continuation dans votre vie personnelle et professionnelle.

Remerciements

Avant tout, je tiens à rendre grâce à DIEU pour la vie, la Santé et la Force qui m'a accordé pour pouvoir parfaire ce travail

Je remercie vivement **Monsieur BOUKIR Abdellatif** d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience, pour son suivi et ses conseils avisés.

Je remercie la Direction de la société **LESAFFRE-MAROC** de m'avoir offert cette opportunité d'apprendre aux côtés de leur personnel qualitatifs et industriels ; messieurs, dames, ce fut pour moi un honneur de vous avoir côtoyé.

Je voudrais adresser toute ma reconnaissance à **Monsieur Ali. BENNANI**, Responsable du service Qualité pour son accueil, son encadrement, sa compréhension, ses conseils et remarques pertinents.

Mr.Abdalali BOUQUADIDA, responsable physico- chimique, mon encadrant de stage dans la société LESAFFRE MAROC qui m'a formé et accompagné tout au long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de patience et de pédagogie. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons eues et les conseils précieux qu'il m'a prodigué tout au long de ce stage.

Aussi, voudrais-je témoigner toute ma profonde gratitude au personnel du laboratoire nominativement, **EL HAJJAMI, MAZOUZ, BOUKHATEM** et **RACHID** pour leur aide, soutien et le lien fraternel que nous eûmes partagés tout au long de ce stage

Pr. OUZZANI CHAHDI Fouad et **Pr. CHAKROUNE Said**, qui ont bien voulu juger ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma considération et ma reconnaissance les plus distinguées.

A tous ceux qui liront un jour ce rapport, j'espère qu'il vous sera utile.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Etude bibliographique

I. Généralité sur la levure.....	2
1. Définition : Saccharomyces servisiae.....	2
2. Composition chimique de la levure.....	3
3. Métabolisation en milieu anaérobie et aérobie.....	3
II. Etude de la mélasse.....	5
1. Définition.....	5
2. Composition chimique moyenne de la mélasse.....	6
3. Inhibiteurs présents dans la mélasse.....	7
4. Tests physico-chimique effectués au sein de Lesaffre Maroc.....	8
a) Détermination du taux du saccharose.....	8
b) Détermination du Taux du Clerget.....	9
c) dosage des sucres réducteurs libres.....	10
5. Les différentes étapes du traitement de la mélasse.....	11

Chapitre II : Etude expérimentale

A. Matériels et méthodes.....	13
I. Protocole expérimental pour la détermination de la toxicité de la mélasse	
1. Méthode classique.....	13
2. Méthode fermento.....	14
Principe.....	14
II. Protocole expérimental pour la détermination des sels d'ammoniums quaternaires	
Principe.....	15
III. Instrumentation.....	16
B. Résultats et discussion.....	17
I. Détermination des limites de toxicité de la mélasse par :	
1. Méthode classique.....	18
2. Méthode fermento.....	31
II. Détermination des sels d'ammoniums quaternaires.....	40
1. Test de toxicité classique.....	42
2. Test fermento.....	43
III. Effets de quelques inhibiteurs sur l'activité enzymatique.....	46
3. Test de toxicité classique.....	46
4. Test fermento.....	47

Conclusion	49
Conclusion générale et perspectives	50
Références Bibliographiques	51

Liste des tableaux

	<i>N° Page</i>
Tableau 1 : Composition chimique moyennes de la levure (d'après HENCKES 2000).....	3
Tableau 2 : Comparaison entre les deux types de métabolisation (aérobie et anaérobie).....	4
Tableau 3 : Composition chimique moyenne en % massique des mélasses de betterave et de canne à sucre.....	6
Tableau 4 : Absorbances d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurées après 17 de fermentation en absence du cycloheximide.....	20
Tableau 5 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR en absence du cycloheximide.....	20
Tableau 6 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR, mesurée après 17h de fermentation à différentes concentrations et à différents volumes de cycloheximide ajoutés.....	21
Tableau 7 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différentes concentrations de cycloheximide.....	21
Tableau 8 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés.....	22
Tableau 9 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de cycloheximide ajoutés	22
Tableau 10 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	23
Tableau 11 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	23
Tableau 12 : Impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de mélasse SUCRAFOR sur la croissance cellulaire.....	24
Tableau 13 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de mélasse SURAC mesurée à différents volumes du cycloheximide ajoutés.....	25
Tableau 14 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de mélasse SURAC à différents volumes de cycloheximide ajoutés.....	25

Tableau 15 :	Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	26
Tableau 16 :	Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	26
Tableau 17 :	Impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de mélasse SURAC sur la croissance cellulaire.....	26
Tableau 18 :	Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de mélasse SUTA mesurée à différents volumes du cycloheximide ajoutés.....	28
Tableau 19 :	Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUTA à différents volumes de cycloheximide ajoutés.....	28
Tableau 20 :	Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	29
Tableau 21 :	Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la soluruin de la mélasse SUTA à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.....	29
Tableau 22 :	impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de la mélasse SUTA sur la croissance cellulaire.....	30
Tableau 23 :	Temps de stabilité de dégagement de CO ₂ à des modes opératoires différents.....	32
Tableau 24 :	Dégagement de CO ₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR.....	34
Tableau 25 :	Dégagement de CO ₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC.....	36
Tableau 26 :	Dégagement de CO ₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUTA.....	38
Tableau 27 :	Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de détergents.....	42
Tableau 28 :	Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR avec différents détergent et à différents volumes.....	42

Tableau 29 :	Dégagement de CO ₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents type de détergents.....	43
Tableau 30 :	Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volume d'inhibiteur	46
Tableau 31 :	Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volume d'inhibiteur ajouté.....	46
Tableau 32 :	Dégagement de CO ₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de l'inhibiteur.....	47

Liste des figures

Figure 1 :	Schéma de la levure de boulanger.....	2
Figure 2 :	Canne à sucre.....	5
Figure 3 :	Betterave.....	5
Figure 4 :	Structure chimique de saccharose.....	8
Figure 5 :	Circuit de la mélasse au sein de la société Lesaffre Maroc.....	12
Figure 6 :	Structure chimique de cycloheximide.....	18
Figure 7 :	Résultats du test sur les mélasses sucrafor et suta (mélasses de betterave).....	40
Figure 8 :	Résultats du test sur les mélasses sucrafor et suta (mélasses de betterave).....	40

Liste des graphes

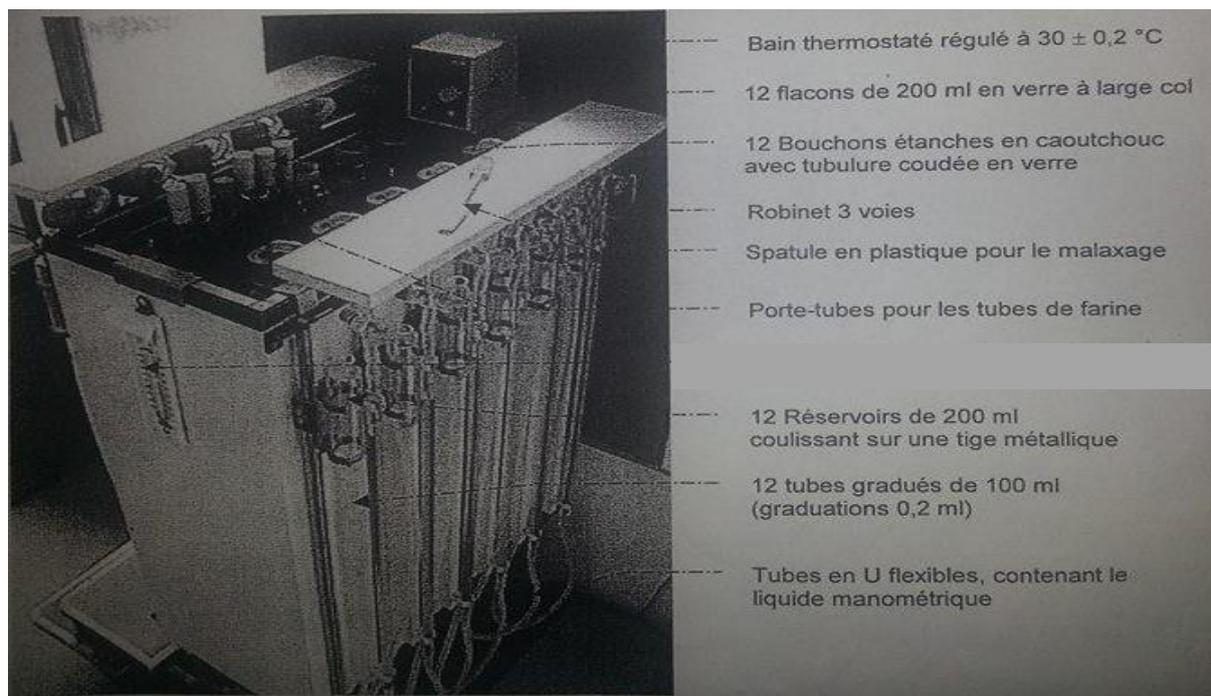
Graphe 1 :	Variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume de cycloheximide ajouté sur la mélasse SUCRAFOR.....	24
Graphe 2 :	Variation de la quantité en matière sèche moyenne de la levure en fonction de volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC.....	27
Graphe 3 :	Variation de la quantité en matière sèche moyenne de la levure en fonction de volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA).....	30
Graphe 4 :	Variation du volume de CO ₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SUCRAFOR.....	35
Graphe 5 :	Variation du volume de CO ₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC.....	37
graphe 6 :	Variation du volume de CO ₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA.....	39
Graphe 7 :	Variation du volume de CO ₂ dégagé en fonction du temps avec différents types de détergents à un volume de 1 ml.....	44
Graphe 8 :	Variation de dégagement de CO ₂ en fonction du temps avec différentes types de détergents à un volume de 5 ml.....	44
Graphe 9 :	Variation de CO ₂ en fonction du temps (bisulfite).....	48
Graphe 10 :	Variation de CO ₂ en fonction du temps (Pb ²⁺).....	48
Graphe 11 :	Variation de CO ₂ en fonction du temps (Cu ²⁺).....	48

Chapitre I
Étude
bibliographique

Chapitre II
Etude expérimentale

Annexes

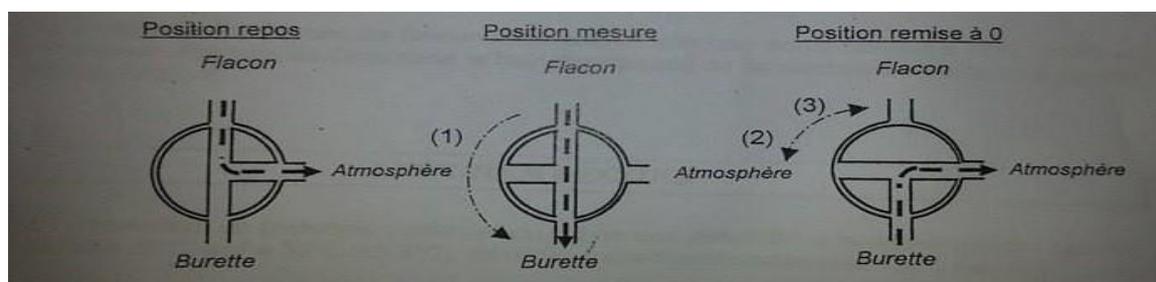
Annexe 1 : Description du fermentomètre



- L'appareil est localisé dans une pièce climatisée à $21 \pm$ à l'abri des courants d'air, de la chaleur et de la lumière directe du soleil.
- Le bain thermostaté doit être réglé à $30 \pm 0,2$ °C et contrôlé à l'aide d'un thermomètre de précision connue.
- Le niveau du liquide manométrique doit être tel que le réservoir est en position haute, le niveau dans la burette se trouve au-dessus du zéro. (pour respecter cette condition, il est conseillé de remplir chaque tube avec =165 ml de liquide).

Schéma explicatif de la mise en pression :

- ✓ Vérifier que le robinet 3 voies de flacon fait bien communiquer la burette et le flacon avec l'atmosphère (position repos)
- ✓ Faire coulisser le réservoir de telle façon que la hauteur du liquide manométrique corresponde au zéro de la burette.



- ✓ A 28 min exactement, tourner d'1/2 tour le robinet 3 voies pour faire communiquer la burette avec le flacon ; position mesure.
- ✓ Effectuer une mise en pression par minute dans l'ordre chronologique.

Annexe 2 : détermination de l'absorbance ou de la densité optique d'une substance chimique

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée, généralement en solution. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Berr-Lambert.

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.



Introduction générale

La qualité des industries agroalimentaires est une préoccupation ancienne et récurrente qui reste toujours au cœur des inquiétudes des consommateurs. Le terme qualité pour les produits alimentaires repose sur trois composantes :

- qualité nutritionnelle, c'est-à-dire l'aptitude de l'aliment à bien nourrir d'un point de vue quantitatif et/ou qualitatif,
- qualité hygiénique. Il s'agit de la «non-toxicité de l'aliment ». Celui-ci ne doit contenir aucun élément toxique à des doses jugées dangereuses pour le consommateur,
- et qualité organoleptique (goût), l'industriel doit donc cibler son marché pour le produit et déterminer le standard de qualité sensorielle qui lui correspond.

Dans l'industrie levurière, pour la bonne qualité de la production de la levure, il est important de bien maîtriser le procédé de fermentation, cela veut dire qu'il faut étudier les différents types d'interactions existant lors de ce procédé et d'identifier les molécules qui sont responsables de l'inhibition de la croissance de la levure.

Toutefois, cette importance ne saurait éclipser celle de contrôle de la toxicité de la mélasse, qui constitue la principale source de carbone et d'énergie pour la levure, en raison de la haute teneur en sucres de celle-ci. Dans ce contexte assez exigeant, le sujet de la mise en œuvre d'une nouvelle méthode d'identification des mélasses toxiques m'a été proposé et ce dans le but de :

- ✓ substituer la méthode classique de contrôle de toxicité par la méthode dite «fermento»,
- ✓ minimiser le temps de contrôle de toxicité,
- ✓ et d'assurer une bonne qualité de production.

Le présent travail est subdivisé en deux chapitres :

Le premier chapitre a été consacré à un exposé bibliographique traitant les différentes problématiques concernant notre étude ; la première section a été dédiée aux généralités sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* où une description de la composition chimique et les différents modes de vie ont été abordés. Quant à la seconde section, elle s'intéresse à l'étude de la mélasse de point de vue composition chimique, les éléments nuisibles qu'elle peut contenir et qui peuvent aussi causer «des stress» au cours du développement de la levure boulangère. Ce chapitre se termine par un rappel des différents tests physico-chimiques effectués sur la mélasse,

Le deuxième chapitre a été réservé à l'étude expérimentale, englobant le volet matériels et méthodes mises en œuvre lors des expérimentations réalisées ainsi que les résultats trouvés pour les trois types de mélasse (SUCRAFOR, SURAC et SUTA) afin d'élaborer un mode opératoire approprié puis trouver des nouvelles limites de toxicité pour la méthode fermento par ajout de cycloheximide comme inhibiteur. Les résultats obtenus ont été comparés et discutés,

Enfin le travail se termine par une conclusion générale.

I. Généralités sur la levure : *saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* occupe une place privilégiée dans les activités industrielles. Elle est utilisée par l'homme depuis des millénaires pour la production de boissons et produits fermentés (vin, bière, pain) et joue un rôle très important dans l'industrie agroalimentaire comme agent de fermentation et pour l'élaboration de produits dérivés.

1. Définition : *saccharomyce cervisiae*

Saccharomyces cerevisiae est un champignon microscopique, unicellulaire, eucaryote et chimio-hétérotrophe de forme ovoïde ou sphérique. Du genre *saccharomyces* due à son affinité envers le saccharose, et d'espèces *cerevisiae* à son rôle dans la fabrication de la bière «cervoise» (LOIEZ, 2003). Elle fut le premier organisme entièrement séquencé (en 1996), ce qui en fait un des organismes les mieux caractérisés. Son génome comporte environ 6000 gènes. Elle est capable de se multiplier par bourgeonnement (MOURET, 2006).

S. cerevisiae utilisée dans la production du vin, de bière, que dans la production des protéines recombinantes. Elle est également utilisée en panification pour la production de biomasse.

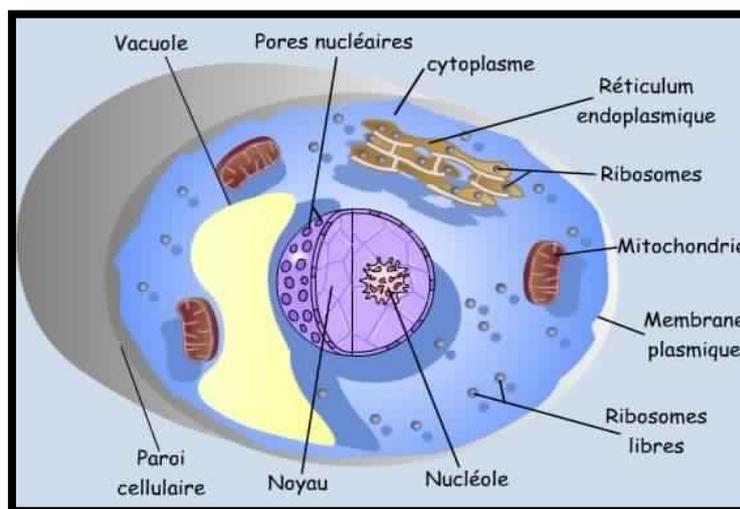


Figure 1: Schéma de la levure de boulanger

Les levures sont en général acidophiles et mésophiles : elles se multiplient à des pH compris entre 3 et 5,8 et à des températures voisines de 25-30°C (HENCKÉ 2000).

Les enzymes présentes dans la cellule de levure au niveau du cytoplasme jouent un rôle capital dans les pâtes levées:

- La maltase, qui agit sur la transformation du maltose en glucose
- **L'invertase**, qui agit sur la transformation du saccharose en glucose et fructose
- La zymase, qui agit sur la transformation du glucose et fructose en dioxyde de carbone et éthanol (gaz de rejet de la fermentation alcoolique).

2. Compositions chimique de la levure

La composition de la levure dépend de ses caractéristiques et de ses conditions de conservation.

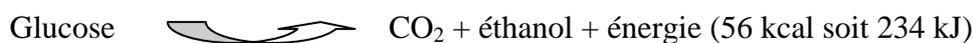
Tableaux 1: Composition chimique moyennes de la levure (d'après HENCKES 2000)

composition	Teneur (%)	Eléments constitutifs	Teneur (%)
Matières sèches	30,0 à 33,0		
Protéines	40,6 à 58,0	Glutathion (1)	0,5 à 1,5
Glucides	35,0 à 45,0	Glycogène	5 à 10
		Tréhalose (2)	8 à 20
Lipides	4,0 à 6,0	Phospholipides	1 à 2
Minéraux	5,0 à 7,5	Potassium	0,8 à 2,0
		Sodium	0,01 à 0,2
		Calcium	0,02 à 0,15
		Magnésium	0,04 à 0,18
		Phosphore	0,8 à 1,3
		Sous forme P ₂ O ₆	2,0 à 3,0
Vitamines	0,002 à 0,06	Thiamine (B1)	0,002 à 0,015
		Riboflavine (B2)	0,002 à 0,008
		Pyridoxine (B6)	0,002 à 0,006
		Niacine (PP)	0,010 à 0,050
(1) Glutathion :tripeptide contenant un groupe sulfhydryle ; c'est un dérivé d'acide aminé (2) Tréhalose : diholoside que l'on rencontre dans de nombreux champignons,levure,algues.			

3. Métabolisation en milieu anaérobie et aérobie

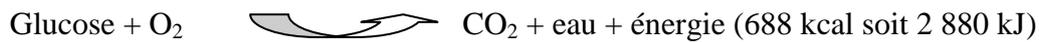
S. cerevisiae est une levure anaérobie facultative. Ce micro-organisme possède deux métabolismes principaux pour produire de l'énergie lorsqu'il est cultivé sur glucose : la fermentation alcoolique et la respiration, les quantités d'énergie libérées sont alors différentes (MOURET, 2006).

- ❖ **En condition anaérobie :** la fermentation est le seul moyen de générer de l'énergie. ainsi L'oxydation du glucose est incomplète ceci est justifié par la présence de l'éthanol selon les réactions suivantes :



Ce métabolisme en anaérobiose porte le nom scientifique de «glycolyse» (dégradation des glucides en pyruvate), qui fait intervenir 30 à 65 % des protéines cellulaires que constituent les enzymes. Le glucose est un sucre constitué de 6 atomes de carbone, pénètre dans la cellule où il subit des réactions de phosphorylations consommatrices d'énergie avant d'être scindé en 2 molécules à 3 atomes de carbones. Ces dernières participent dans une série de réactions aboutissant au pyruvate, qui, en l'absence d'oxygène, est transformé en acétaldéhyde (CH₃CHO) puis en éthanol (C₂H₅OH) et sera ensuite excrété par la cellule.

- ❖ **En condition aérobie** : l'oxydation du glucose est complète ceci est expliquée par les réactions suivantes :



Comme en milieu anaérobie, le glucose suit la voie de la glycolyse jusqu'à la formation de pyruvate, qui est ensuite transformé en acétyl-CoA (CH₃.CO-S-CoA) et à cause de son meilleur rendement énergétique participant ainsi au cycle de Krebs. C'est la voie respiratoire utilisée préférentiellement par la levure.

En présence de forte concentration en sucre comme le glucose, le fructose ou le saccharose (supérieure à 1,5 g/L), en conditions aérées, *S. cerevisiae* adopte un métabolisme énergétique essentiellement fermentatif (à 80%) et très peu de glucose est «respiré». Le métabolisme respiratoire sera installé à l'épuisement des sucres (ceci se traduit d'ailleurs par une augmentation de la quantité de mitochondries intracellulaires) ; et la levure sera capable de cataboliser l'éthanol produit par respiration aérobie. C'est **l'effet Crabtree** appelé aussi « **effet glucose** ».

Tableau 2 : Comparaison entre les deux types de métabolisation (aérobie et anaérobie)

	<u>Type aérobie</u>	<u>Type anaérobie</u>
	Levures préférant un métabolisme respiratoire en aérobie	Levures préférant un métabolisme fermentaire même en aérobie
Utilisation du glucose en aérobie	< 30 %	> 90 %
Transformation totale du glucose en :	CO ₂ et H ₂ O	Ethanol
Rendement énergétique	Elevée	Faible
Utilisation du glucose dans la synthèse de biomasse	Peu	Importante

II. Etude de la mélasse

La levure est cultivée sur un substrat sucré, généralement de la mélasse, co-produit de sucrerie, en raison de sa richesse en saccharose constitue un milieu favorable pour la croissance de ce micro-organisme.

1. Définition

La mélasse, est un résidu du raffinage du sucre extrait de la canne à sucre ou de la betterave, non cristallisable, de couleur foncée que l'on trouve souvent sous forme de poudre marron et visqueux ou d'un sirop très épais et également très visqueux (BOURAS et al).

Elle contient plus de 40 % de sucre, très riche en minéraux « potassium, calcium, magnésium, phosphore ».

C'est une substance très nutritive pour les levures et les bactéries dans les fermenteurs.

Sa richesse en composés nutritifs pour les levures nécessite son utilisation comme substrat essentiel dans l'industrie de la fermentation.

Il existe trois types de mélasse utilisable par la société Lesaffre Maroc :

- Mélasse de betterave,
- Mélasse de canne a sucre,
- Mélasse de raffinerie.



Figure 2 : la canne à sucre



Figure 3 : la betterave

- **La mélasse de canne à sucre** : coproduit, recueilli lors de la fabrication de sucre provenant de la canne à sucre. Elle présente sous la forme d'un liquide visqueux et homogène. Elle est produite dans les pays tropicaux, à climat chaud et humide. Elle constitue 45 % de sa teneur en sucre.

- **La mélasse de betterave** : provient de la fabrication du sucre extrait de la betterave. C'est un liquide visqueux et homogène de couleur marron. Elle est produite dans les régions tempérées, principalement en Europe. Le sucre, essentiellement le saccharose, est le composant le plus important de la mélasse de betterave (de 45 à 50%). Elle est légèrement moins riche en sucre en comparaison avec la mélasse de canne.
- **Mélasse de raffinerie** : provient du raffinage des sucres roux de canne et de betterave, sa teneur en sucre particulièrement élevée (50 à 60 %) et ses caractéristiques organoleptiques la rendent susceptible (dans certaines conditions) d'être utilisée dans la fabrication de produits alimentaires (confiserie, biscuiterie...).

2. Composition chimique moyenne de la mélasse

En raison de la haute teneur en sucres, la mélasse constitue la principale source de carbone et d'énergie pour la levure, elle constitue également une source d'azote, de phosphate, de combinaisons sulfurique et des sels minéraux, des éléments sous forme de traces et des stimulateurs de croissance. D'autre part, il n'est pas rare que la mélasse contienne à différents concentrations des matières nuisibles aux cellules (nitrite, acide formique,...) (Bouras et al).

Tableau 3 : Composition chimique moyenne en % massique des mélasses de betterave et de canne à sucre

	Mélasse de betterave	Mélasse de canne à sucre
Eau	16,5	20,00
Sucres	53	62
Saccharose	51	32
Glucose	00	14
Fructose	00	16
Raffinose	1	00
Eléments azotés	Env-15,0	Env-6,0
Cendres	11,5	8,0
K ₂ O	Variable	Variable
P ₂ O ₅	Assez peu	Un peu plus
Mg	Assez peu	Assez peu
Stimulation de croissance	-	-
Ac. Pantothénique (ppm)	50-100	50-120
Biotine (ppm)	0,02-0,1	1-3
pH	Faiblement alcalin (> 7)	Faiblement acide (4,5-6)
Taux des solides	0,3 – 0,5	≥1,0
• Env : environ		

Quelque soit l'origine de la mélasse, betterave ou canne, La teneur en sucres totaux est sensiblement la même (comprise entre 53 et 62 % de MS), mais présente quelques écarts suivant le procédé industriel appliqué aux mélasses.

3. Inhibiteurs présents dans la mélasse

Il existe un grand nombre de composants présents dans la mélasse qui peuvent être des inhibiteurs de croissance selon leurs concentrations. On distingue :

- **L'ammonium quaternaire, sulfites,**
- fongicides, des minéraux en excès comme Na⁺ provenant des techniques agricoles ou sucrières,
- Des acides gras à chaînes courtes, les cires et les graisses,
- Selon LAFAR une concentration de 6,8 -9,2 mg/l de SO₂ a un effet défavorable sur l'activité fermentative des levures,
- Les nitrites et les nitrates,
- Les acides organiques volatiles comme l'acide acétique, formique et butyrique qui ne doivent pas dépasser 0,1-0,3% en volume utile dans le fermenteur,
- Les substances colorantes comme le caramel, les mélanoidines et les phénols de fer ne doivent pas dépasser 0,6% en volume utile pour limiter leurs effets sur la coloration du produit fini,
- Les colloïdes et les matières en suspensions résultant de composés d'adsorption comme la pectine et le sucre, les substances gommeuses et la mucine,
- Les métaux lourds comme **le cuivre** et **le plomb**.

Cet ensemble complexe de composés inhibiteurs de la croissance et production de la levure ne sauraient être conservés dans la mélasse finale, donc sont séparés au cours de l'étape de clarification essentielle de la pureté de la mélasse. Toutefois, la présence de levures sauvages exige que la mélasse passe par un prétraitement élaboré en circuit.

4. Tests physico-chimiques effectués sur la mélasse au sein du laboratoire Lesaffre Maroc:

a) Détermination du taux du saccharose

Principe

Le saccharose est un diholoside de formule chimique $C_{12}H_{22}O_{11}$ constitué par une molécule de glucose et une molécule de fructose, c'est le sucre de table extrait de la betterave sucrière et de la canne à sucre.

L'emploi de saccharose comme substrat de fermentation est connue depuis bien longtemps.

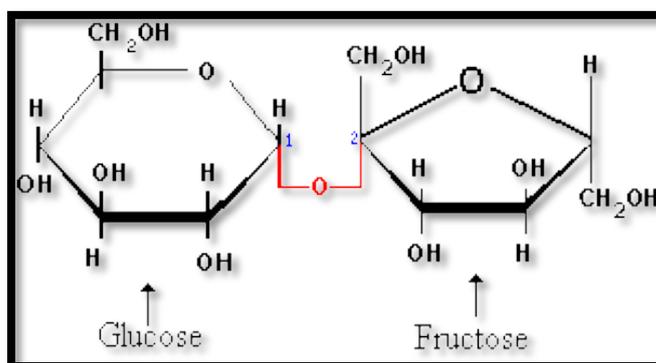


Figure 4 : Structure chimique de saccharose

Mode opératoire

Dans des fioles jaugées de 200 ml, on introduit successivement environ 16 g de la canne, 16 g de betterave et 20 g de la mélasse diluée. On ajoute 25 ml d'acétate de plomb basique sur la canne et 15 ml de la même solution sur la betterave et la mélasse diluée tout en agitant, puis on complète à 200 ml avec de l'eau distillée et on filtre la solution à l'aide du papier filtre pour récupérer le filtrat.

Calcul du taux du saccharose

La mesure de taux de saccharose (recherche de l'angle de rotation α_1) a été effectuée à l'aide d'un Polarimètre. Il est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux du saccharose (\%)} = \alpha_1 \times 10 \times 0,77/PE$$

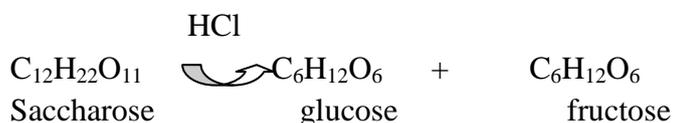
avec :

- α_1 : angle de rotation,
- 10: facteur de dilution,
- 0,77: constante de l'appareil,
- PE : prise d'essai.

b) Détermination du Taux du Clerget:

Principe

Clerget ou sucres invertis, est composé de glucose et de fructose en proportions égales, avec éventuellement une fraction de saccharose résiduelle.



Clerget est un test spécifique pour la mélasse de betterave, car elle contient une quantité importante de saccharose, ce test consiste au clivage du saccharose en fructose et glucose, car la levure digeste facilement les sucres sous forme dissociée.

Mode opératoire

Le mode opératoire est le même que celui du saccharose.

Après filtration, on prend environ 50 ml du filtrat, on y ajoute 5 ml d'acide chlorhydrique (37 %) tout en agitant. Ensuite on chauffe notre solution au bain marie à 70°C.

Après refroidissement on ajoute à notre solution une quantité du charbon actif en agitant, et après quelques minutes on fait une double filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre et on récupère le filtrat.

Calcul du Clerget

A l'aide d'un polarimètre on mesure la polarisation du filtrat c'est-à-dire l'angle de rotation α_2 , le Clerget est calculé par l'équation suivante

$$\% \text{Clerget} = ([\alpha_1 + (10 \times \alpha_2)] \times 0,77 / [144 - (T^\circ/2)]) \times \text{PE}$$

avec :

- α_1 : angle de rotation du saccharose
- α_2 : angle de rotation du saccharose inverti
- 1,1 : facteur de dilution
- 0,77 : constante de l'appareil
- PE : prise d'essai
- T° : température du filtrat en (°C).

c) dosage des sucres réducteurs libres :

Principe

Les sucres réducteurs sont des sucres simples réactifs donneurs d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction. On peut citer le glucose, le fructose et le maltose. C'est un test spécifique pour la mélasse de canne, car elle est plus riche en sucres réducteurs qu'en saccharose.

Mode opératoire

On pèse 20 g de mélasse dans une fiole de 200 ml, on y ajoute quelques ml d'acétate de plomb et on complète à 200 ml avec de l'eau distillée. On filtre notre mélange à l'aide d'un papier filtre et on récupère le filtrat. On prélève 2ml de filtrat, on y ajoute 10 ml de double tartrate de sodium et 10 ml de Sulfate du cuivre en agitant puis on complète à 30 ml avec de l'eau distillée. On porte le mélange à ébullition pendant 8 minutes. Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'acide acétique (5N) et 20 ml d'une solution d'iode (N/30) tout en agitant, Ensuite on titre notre solution par les thiosulfates de sodium (N/30) en présence d'empois d'amidon comme indicateur coloré. Le virage est indiqué par le changement de coloration de vert en bleu.

On effectue aussi un dosage du blanc.

La prise d'essai du filtrat est en fonction de la concentration des sucres réducteurs dans la mélasse.

Calcul du taux des sucres réducteurs

Le taux des sucres réducteurs est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux des sucres réducteurs (\%)} = (V(\text{blanc}) - V(\text{échantillon}) \times 1,03) / PE \text{ (g)}$$

Avec:

- **V (blanc)** : volume des thiosulfates de sodium versé lors du dosage du blanc.
- **V (échantillon)** : volume des thiosulfates de sodium versé lors du dosage de l'échantillon.
- **1,03**: facteur de dilution.

Remarque :

- ✓ L'acétate de plomb est utilisé pour éliminer tout ce qui est non sucres comme les protéines et les vitamines.
- ✓ L'acide acétique est utilisé dans le but de neutraliser la solution.
- ✓ L'acide chlorhydrique précipite $PbCl_2$ (dans le cas de Clerget).

5. Les différentes étapes du traitement de la mélasse

L'approvisionnement en mélasse du site de production se fait par camion. La mélasse est ensuite pompée vers les différents tanks de stockage (quatre pour la mélasse issue de betterave et les trois autres pour celle de la canne) Une homogénéisation assurée par des pompes est très nécessaire.

Puis, mélangées dans des proportions de 20% de canne et 80% de betterave. Le mélange est ensuite dilué à 50% (mélasse diluée MD), puis portée à la température de 70°C par la vapeur d'eau en vue d'une clarification facile.

Le circuit de la mélasse au sein de la société Lesaffre Maroc est présent par le schéma suivant :

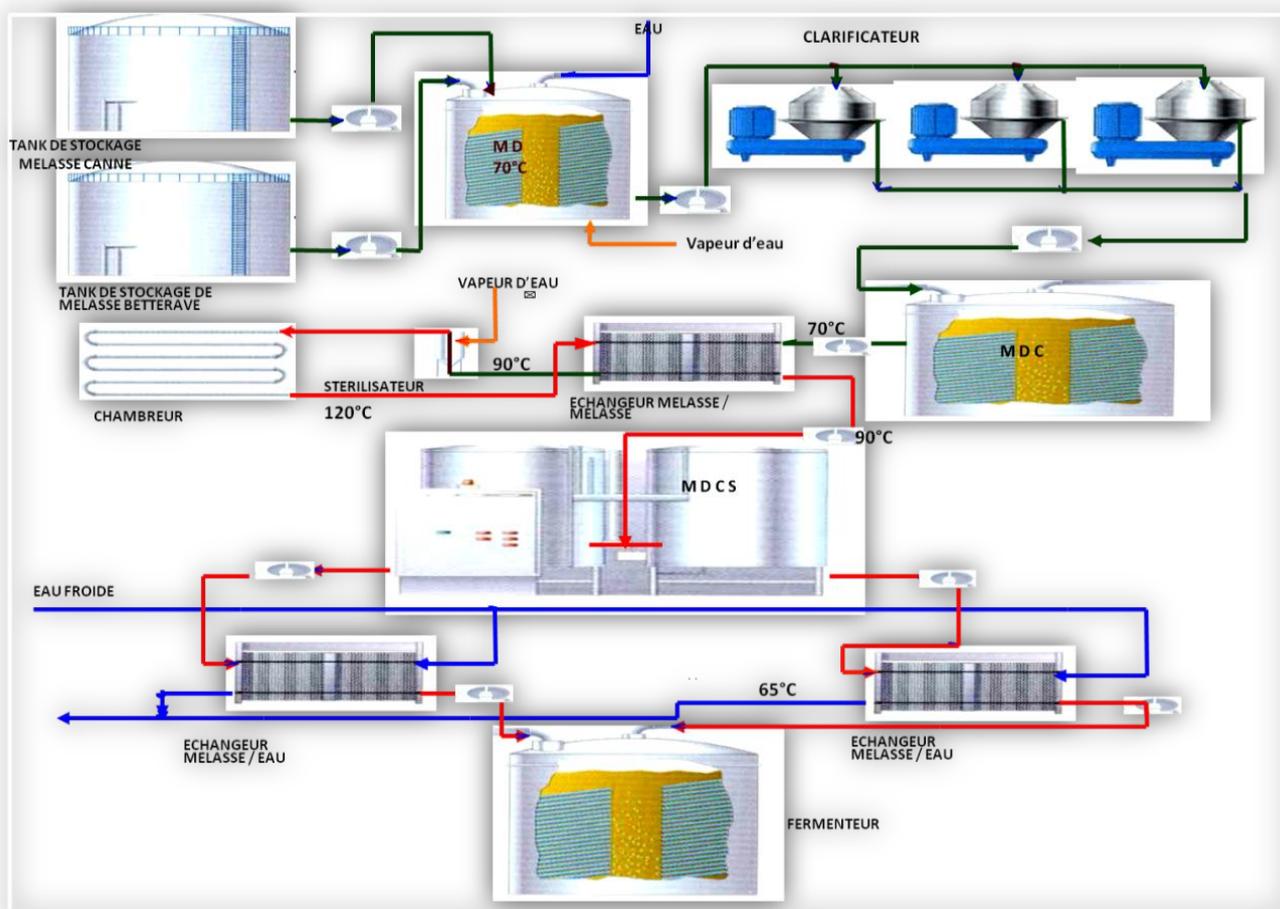


Figure 5 : Circuit de la mélasse au sein de la société Lesaffre Maroc

Clarification

C'est une centrifugation où un « bol » (rotor à parois pleines) est mis en rotation sur un axe vertical permettant une séparation liquide-solide. Une fois la clarification enclenchée sous l'effet de la force centrifuge, les particules en suspension de densité élevée sédimentent. Elles peuvent être par la suite évacuées de façon discontinue (bols tubulaires, à chambres concentriques ou à assiettes) de façon continue d'une manière périodique (bols à assiettes auto débourbeurs) ou de façon permanente (bols à assiettes et à buses). La clarification permet l'élimination des restes de matières en suspension de la mélasse diluée (colloïdes, boues...) mais permet aussi d'éviter un colmatage ultérieur des conduites de mélasse au cours de son acheminement vers les fermenteurs.

Stérilisation

Pour parfaire l'innocuité de la mélasse diluée clarifiée (MDC), celle-ci est stérilisée après l'étape de clarification sous un barème de stérilisation de 120°C pour un débit de 8m³/h. Ceci permet de détruire la flore microbienne y compris les spores d'où le nom de mélasse diluée clarifiée stérilisée (MDCS). Cette dernière est refroidie par un échangeur à plaques mélasse-eau afin d'abaisser la température à 34 – 36°C adéquate pour la fermentation.

La stérilisation est une étape très importante dans l'unité de traitement de la mélasse puisque ça élimine tout risque de contamination ultérieure de la levure lors de la production de la biomasse mais aussi de la santé du consommateur par la suite.

Refroidissement :

Avant d'être utilisée dans la fermentation, la MDCS passe dans des refroidisseurs, qui sont des échangeurs thermique à plaques mélasse / eau froide, la mélasse se refroidie ainsi que l'eau se réchauffe qui sera utilisée dans la dilution par la suite.

A. Matériels et méthodes

I. Protocole expérimental pour la détermination de la toxicité de la mélasse

1. méthode classique :

Mode opératoire

Peser dans un bécher :

- 17 g de mélasse,
- 2 g d'extrait de levure.

On ajoute au mélange 50 ml de l'eau distillée, et on laisse agiter pendant quelques minutes, puis on ajoute de l'eau distillée de façon que le poids total du mélange soit égal à 100 g,

-Pipeter 20 ml de la solution dans une fiole de fourneau de 125 ml comme témoin et un autre 20 ml comme l'essai (contient le cycloheximide),

-Boucher les fioles avec du coton et couvrir le coton avec du papier aluminium,

-Stériliser les fioles et une pipette de 1 ml (à utiliser plus tard) à 1 bar pendant 10 min,

-Toujours étiqueter les fioles,

-Laisser refroidir quelques minutes après la stérilisation puis injecter dans la fiole test 1 ml de la solution de levure et mettre toutes les fioles dans le bain marie à 31°C sous agitation pendant 17h,

-Sortir les fioles du bain marie après 17h et agiter légèrement chaque fiole pour homogénéiser la solution,

-Prélever 2 ml et le mettre dans une fiole de 200 ml puis compléter à l'eau distillée et mesurer l'absorbance à l'aide du spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

NB : chaque fraction de cycloheximide est ajoutée dans 100 g de mélasse.

2. méthode Fermento :

Principe :

L'activité fermentative ou force de la levure est égale au volume de CO₂ dégagé durant un temps donné, par une quantité précise de levure incorporée dans une pâte de composition connue. C'est la levure fraîche qui sera utilisée dans l'étude.

Mode opératoire :

- Contrôle des bains thermostatés,
- Peser dans un bécher 3g de mélasse + 0,11g d'extrait de levure +50 ml d'eau distillée,
- Mélanger pour homogénéiser les solutions,
- Compléter à 100g avec de l'eau distillée, les mêmes étapes citées précédemment ont été suivies,
- Pipeter 20ml de la solution dans chaque fiole et boucher les avec un coton,
- Stériliser les fioles à 1 bar pendant 10 min,
- Prise d'essai de levure (5 mg en MS),
- Préparation des suspensions de levure,
- mettre les fioles contenant la mélasse pendant 15 min dans le bain,
- ajouter la levure et boucher les fioles,
- faire la mise en pression après 15 min,
- lecture des volumes de CO₂ dégagé chaque 10 min.

Matériels

- Bécher,
- Balance,
- Agitateur,
- Spatule,
- Fiole de fourneau,
- Coton,
- Bain marie,
- Stérilisateur (autoclave),
- Spectrophotomètre.

Réactifs

- ✚ Levure fraîche,
- ✚ L'extrait de levure,
- ✚ Saccharose,
- ✚ Mélasses,
- ✚ L'eau distillée,
- ✚ Cycloheximide

II. Protocole expérimental pour la détermination des sels d'ammonium quaternaires antiseptiques :

Principe :

Les sels d'ammoniums quaternaires à longue chaîne donnent en milieu alcalin avec les colorants sulfoniques du type hélianthines des sels colorés très solubles dans le chloroforme ce qui permet leur extraction. L'hélianthinate d'ammonium quaternaire en solution chloroformique traité par une solution aqueuse chlorhydrique, libère l'hélianthine qui passe dans la phase aqueuse en le colorant en rose.

Mode opératoire

1) Préparation de la solution aqueuse d'hélianthine

Dissoudre à chaud 0,15 g d'hélianthine dans 100 ml d'eau distillé, laisser refroidir

Filtrer si la solution présente un dépôt.

2) Préparation de la lessive de soude pure p.a (d=1,3) : dilué au demi

Dissoudre 20 g de NaOH dans une fiole de 100 ml

NB : il faut que l'entonnoir, la fiole soit sèche

3) Manipulation :

Le matériel lavé à l'eau chaude puis l'alcool 95% et séché à l'étuve. En effet s'il y a des traces de détergents anionique (savon, dérivés sulfonique) elles inhibent la réaction colorée.

- Peser 10 g de mélasse brute dans un erlenmeyer de 250 ml,
- Dilué avec un peu d'eau chaude et transvaser dans une fiole de 100 ml,
- Refroidir la solution à 20°C et compléter au trait de jauge à l'eau distillé,
- Fixer l'ampoule à décanter à son support et introduire successivement et en agitant :
 - ✓ 50 ml de mélasse dilué à 100%,
 - ✓ 0,5 ml de la solution d'hélianthine à 0,15%,
 - ✓ 1 ml de la lessive de soude dilué au demi,
 - ✓ 20 ml de chloroforme.
- Fermer l'ampoule à décanter la retirer de son support et l'agiter vigoureusement par retournement pendant 3min,
- Fixer à nouveau l'ampoule à son support et la laisser décanter,
- Mettre une cuillère (± 5 g) de sulfate de sodium dans le verre à pieds et laisser couler environ 15 ml de l'émulsion chloroformique (la solution inférieure de l'ampoule) dans le verre à pieds,
- Triturer énergiquement avec un agitateur en verre,
- Après quelques minutes décanter l'émulsion chloroformique du verre à pied dans un erlenmeyer de 125 ml contenant 5 à 10 g de sulfate de sodium anhydre,

- Rincer le sulfate de sodium contenu dans le verre à pied par trituration avec 5 fractions de 5 ml de chloroforme pur,
- Mettre chaque fraction dans l'erenmeyer,

NB : si la solution n'est pas claire on fait un autre lavage de la solution par le sulfate de sodium (5 à 10 g) pesé dans un autre erlenmeyer

- Agiter le contenu de l'erenmeyer final pendant quelques minutes pour permettre l'élimination complète du liquide aqueux,
- Filtrer le tout dans le tube à essai au moyen d'un entonnoir en plastique contenant du papier filtre,
- A l'aide d'une pipette de 1 ml ajouter 0,5 ml d'HCl à 20%,
- Boucher le tube et agiter bien,
- Dépose le tube dans le portoir et faire la lecture.

Matériels

- Ampoule à décanter de 100 à 125 ml,
- Eprouvette,
- Erlenmeyer,
- Fiole,
- Agitateur en verre,
- Tube à essai 16×160mm avec bouchon bakélite,
- Support pour l'ampoule à décanter,
- Entonnoir, papier filtre plissé,
- Spatule,
- Portoir pour les tubes à essai.

Réactifs

- ✚ Hélianthine (orange de méthyle),
- ✚ NaOH (d=1,33),
- ✚ Chloroforme,
- ✚ Sulfate de sodium anhydre,
- ✚ Acide chlorhydrique à 20%,
- ✚ Ethanol à 95%.

III. Instrumentation

- **Spectrophotomètre UV** : MILTON ROY, SPECTRONIC 601
- **Thermostat** : 19720160 Polystat 36, Fisher, Bioblock Scientific

B. Résultats et discussions

Objectif de l'étude :

La mélasse, connue par sa haute teneur en sucres, constitue la principale source de carbone et d'énergie de la levure. Cependant, elle présente des éléments toxiques pouvant être des inhibiteurs de la croissance de la levure.

Pour pallier ce problème, nous avons essayé une nouvelle méthode de contrôle de toxicité déterminée par la stabilité du dégagement de CO₂ en se basant sur la méthode classique permettant la stabilité de la biomasse. Étant donné que la méthode chimique dure environ 10h plus que la nouvelle méthode ; 17h de temps minimum pour la 1^{ère} et 7h de temps pour la 2^{ème} méthode.

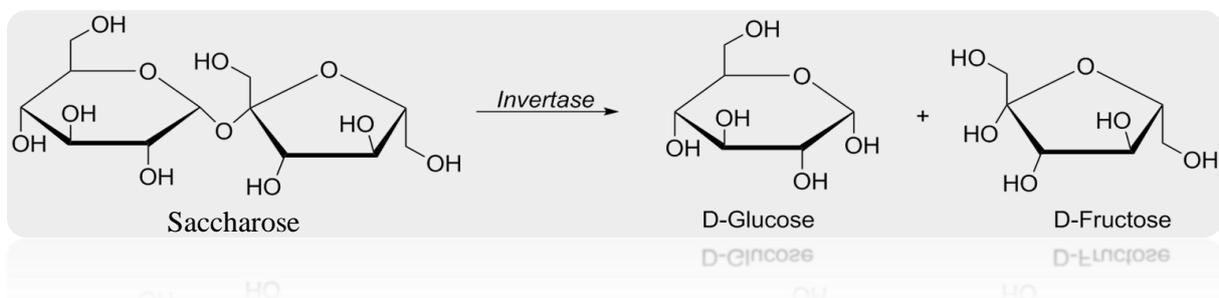
Le but principal de cette nouvelle méthode est de minimiser le temps de contrôle de toxicité de la mélasse à 7h.

Pour ce faire, nous avons élaboré un mode opératoire approprié, puis nous avons essayé de trouver les limites de toxicité à l'aide de la nouvelle méthode en ajoutant le cycloheximide comme inhibiteur à la mélasse à différentes concentrations et différents volumes.

Parallèlement à cela, nous avons essayé de détecter la présence des ions ammoniums quaternaires connus comme inhibiteurs très puissants et présentant un effet nuisible pour le fonctionnement de la cellule. Une question qui reste posée sur l'origine de ces ammoniums quaternaires.

Finalement, nous avons détecté l'influence de quelques inhibiteurs sur l'activité enzymatique.

Au cours de la fermentation, la levure synthétise l'enzyme responsable de la dégradation du saccharose en glucose et fructose. La réaction de dégradation du saccharose par l'invertase est la suivante :



L'invertase ou β -fructofuranosidase, est un glycoside hydrolase qui hydrolyse le saccharose (sucrose), un fructofuranoside, en glucose et fructose par rupture des liaisons β -fructofuranosique, ces derniers sont des sucres simples assimilables par la levure.

La présence des inhibiteurs dans la mélasse empêche la formation de cette enzyme (invertase), et par conséquent blocage de la multiplication cellulaire.

I. Détermination des limites de toxicité de la mélasse :

1. Méthode classique :

La méthode classique de calcul de toxicité de la mélasse repose sur le calcul de la quantité en biomasse par mesure de la matière sèche totale. Notez que cette méthode dure environ 17h.

Le test de toxicité classique a pour but de :

- ✚ S'assurer qu'on travaille avec une mélasse qui répond aux normes recommandées,
- ✚ Détecter l'effet de l'inhibiteur (cycloheximide) sur la multiplication de la levure,
- ✚ Fixer la concentration de cycloheximide sur laquelle on va travailler,
- ✚ Trouver les volumes de cycloheximide, qui correspondent aux limites inférieures et supérieures des trois types de mélasse utilisées, à la même concentration préalablement fixée, au sein de la société Lasaffre Maroc à savoir : SUCRAFOR, SURAC et SUTA.

Cette méthode serait un point de départ afin de la substituer par une nouvelle méthode dite « fermento ». Cette dernière sert à économiser le temps de contrôle de la mélasse si jamais une interruption est arrivée.

- ❖ **Cycloheximide**, également connu sous le nom d'actidione, de formule $C_{15}H_{23}NO_4$, est un antifongique qui bloque la biosynthèse des protéines chez les cellules eucaryotes en se liant avec **le ribosome 80S**. Vu son haut niveau de toxicité chez l'humain, il n'est pas utilisé comme antibiotique.

Il est utilisé dans divers milieux d'isolement de champignons pathogènes en tant qu'inhibiteur de certains champignons non pathogènes comme les levures.

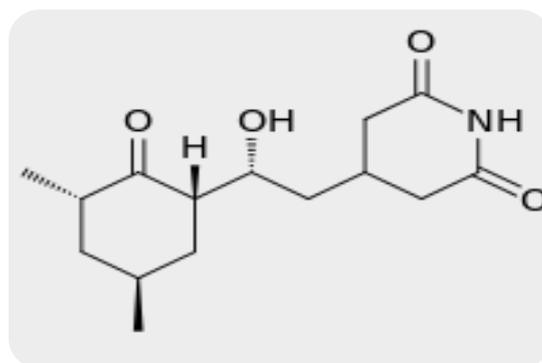


Figure 6 : Structure chimique de cycloheximide

C'est un inhibiteur qui n'existe pas dans la mélasse.

Les relations utilisées pour le calcul de degré de toxicité de la mélasse sont les suivantes :



$$Q \text{ (Quantité de la levure en matière sèche)} = A \times 2000 \times 0,44 \quad (1)$$



$$R \text{ (toxicités)} = \sqrt[17]{(Q/2,5)} \quad (2)$$

Avec

- **A** : absorbance sans unité
- **2000** : facteur de dilution
- **0,44** : facteur de conversion
- **2,5**: Masse de levure en mg incubée dans chaque fiole de fourneau contenant 20 ml de mélasse

Limite de toxicité

- | | |
|--|--|
| • $Q \leq 90$ mg/20 ml mélasse toxique | • $R \leq 1,242$ la mélasse toxique |
| • $90 \text{ mg/20 ml} < Q \leq 140 \text{ mg/20 ml}$
mélasse moyennement toxique | • $1,242 < R \leq 1,272$ la mélasse
moyennement toxique |
| • $Q > 140$ mg/20 ml mélasse non toxique | • $R > 1,272$ mélasse non toxique |

Notre recherche a commencé avec la mélasse SUCRAFOR sur laquelle nous avons effectué différents tests avec différentes concentrations et différents volumes de cycloheximide, d'abord pour déterminer l'intervalle approximatif de sa concentration et les volumes sur lesquels s'est basée notre étude et réduire notre champ de travail, ensuite étaler la recherche sur les autres mélasses.

Après avoir effectué le test de toxicité classique sur les mélasses étudiées, nous avons mesuré les absorbances (ou densité optique) à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600 nm, dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique.

Mélasse SUCRAFOR

Les résultats reportés dans le tableau ci-après ont été effectués sur la mélasse SUCRAFOR sans ajout de cycloheximide afin de s'assurer que les mélasses utilisées au sein de la société ne sont pas toxiques.

Tableau 4 : Absorbances d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurées après 17 de fermentation en absence du cycloheximide

	Sans cycloheximide		
<u>Absorbance (A)</u>	0,300	0,269	0,312
	0,295	0,300	0,250
	0,285	0,328	0,315

A partir des absorbances obtenues, la quantité en matière sèche a été calculée en utilisant la relation suivante :

$$\checkmark \text{ Q (quantités de la levure en matière sèche par 20 ml) = A} \times 2000 \times 0,44$$

Les résultats sont regroupés dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR en absence du cycloheximide

	Sans cycloheximide		
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche /20 ml de la solution de mélasse</u>	264,00	236,72	274,56
	259,60	264,00	220,00
	249,92	288,64	277,20

D'après le tableau 5, les valeurs de la quantité en matière sèche calculée se trouvent au-dessus de la limite supérieure de toxicité (140 mg de matière sèche /20ml) cela montre que la mélasse n'est pas toxique, elle peut être utilisée en tant qu'élément nutritif pour la multiplication cellulaire de la levure.

Du fait que la mélasse n'est pas toxique et dans le but de déterminer les volumes de l'inhibiteur correspondant aux limites inférieure et supérieure de toxicité, nous avons procédé par addition du cycloheximide à la mélasse à différentes concentrations et à différents volumes.

Les résultats récoltés sont indiqués dans le tableau ci-dessous après avoir effectué trois répétitions sur chaque test.

Tableau 6 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR, mesurée après 17h de fermentation à différentes concentrations et à différents volumes de cycloheximide ajoutés

	Avec cycloheximide							
Variation des concentrations en g/l et volumes en ml de cycloheximide ajouté à 100g de mélasse	1	0,1	0,05	0,01			0,001	
	1	1	1	1	0,75	0,5	0,25	1
<u>Absorbance(A)</u>	0,006	0,009	0,010	0,013	0,018	0,024	0,119	0,212
	0,005	0,010	0,010	0,014	0,018	0,025	0,117	0,213
	0,006	0,008	0,012	0,014	0,017	0,022	0,119	0,216

La détermination de la quantité en matière sèche se fait en utilisant l'équation (1) citée en page 19, les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 7 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différentes concentrations de cycloheximide

	Avec cycloheximide							
Variation des concentrations (g/l) et volumes (ml) de cycloheximide à 100 g de mélasse	1	0,1	0,05	0,01			0,001	
	1	1	1	1	0,75	0,5	0,25	1
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche /20 ml de la solution de mélasse</u>	5,28	7,92	8,80	11,44	15,84	21,12	104,72	186,56
	4,40	8,80	8,80	12,32	15,84	22,00	102,96	187,44
	5,28	7,04	10,56	12,32	14,96	19,36	104,72	190,08

D'après les résultats du tableau 7, L'addition de cycloheximide à différentes concentrations et à différents volumes sur la mélasse SUCRAFOR, nous a permis de constater qu'il y a un blocage de la croissance de la levure, à des concentrations de : 1 , 0,1 , 0,01 et 0,05 g/l de cycloheximide ajoutés, ce qui s'explique par la forte toxicité de mélasse. Cependant, la concentration de 0,001 g/l de cycloheximide ne présente aucun effet observable sur le fonctionnement de la cellule.

Remarque :

Une mélasse est légèrement toxique si la quantité de la levure en MS est située entre 90 et 140 mg de MS par 20 ml de solution de mélasse. C'est le cas de la concentration de 0,01 g/l avec un volume de 0,25 ml de cycloheximide ajouté sur la mélasse SUCRAFOR.

Il est à rappeler que notre but est d'essayer de trouver les volumes de cycloheximide correspondant aux limites inférieure (90 mg de MS) et supérieure (140 mg de MS), c'est pourquoi, il faut travailler soit, avec une concentration de 0,01 g/l dont les volumes de cycloheximide sont inférieurs à 0,25 ml, ou avec la concentration de 0,001 g/l dont les volumes sont supérieurs à 1 ml.

Dans la suite des tests, nous avons opté pour la concentration de 0,001 g/l de cycloheximide et nous avons choisi de travailler avec les volumes suivants : 1,25 ; 1,5 ; 1,75 et 2 ml de cycloheximide sur lesquelles nous avons effectué le même test que précédemment.

Les résultats des absorbances obtenues ont été résumés dans le tableau suivant :

Tableau 8 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Absorbance (A)</u>	0,200	0,177	0,144	0,100
	0,201	0,178	0,145	0,101
	0,203	0,176	0,143	0,102

Les résultats de la quantité de levure en matière sèche obtenue, sont montrés dans le tableau 9 :

Tableau 9 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de mélasse</u>	176,00	155,76	126,72	88,00
	176,88	156,64	127,60	88,88
	178,64	154,88	125,84	89,76

Après l'analyse du tableau 9, nous avons trouvé que les volumes de 1,25 et 1,5 ml de cycloheximide ne présentent pas un effet sur la multiplication de la levure et donc, la mélasse est considérée comme étant non toxique. Toutefois, le volume de 1,75 ml présente une légère toxicité s'explique par la quantité de la levure en MS située entre 90 et 140 mg. On augmente de plus le volume de cycloheximide à 2 ml, nous avons observé que la quantité de levure en matière sèche a été proche de la limite inférieure de toxicité (90 mg), ce volume correspond donc à la limite inférieure au-dessous de laquelle il y a toxicité.

Jusqu'à maintenant, nous avons trouvé que le volume de cycloheximide correspond à la limite inférieure, il nous reste de retrouver le volume à laquelle on a une quantité de matière sèche de 140 mg. Pour ce faire, nous avons effectué le même test pour les volumes suivants : 1,55 ; 1,6 ; 1,65 et 1,7 ml.

Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,55	1,6	1,65	1,7
<u>Absorbance (A)</u>	0,174	0,170	0,165	0,154
	0,174	0,169	0,166	0,160
	0,175	0,170	0,164	0,159

Comme précédemment le calcul de la quantité en matière sèche se fait à l'aide de la relation (1), dont les valeurs sont mentionnées dans le tableau ci-après :

Tableau 11 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe.

Concentration(g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,55	1,6	1,65	1,7
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de mélasse</u>	153,12	149,60	145,20	139,92
	153,12	148,72	146,06	140,80
	154,00	149,60	144,32	139,92

Les résultats cités dans le tableau montrent que le volume de cycloheximide correspond à la limite supérieure de toxicité est de 1,7 ml, avec une quantité de matière sèche presque égale à 140 mg, tandis que les autres volumes présentent une légère toxicité.

D'après tous les tests effectués sur la mélasse SUCRAFOR, on peut conclure que l'intervalle des volumes, où il y a une légère toxicité de la mélasse, est situé entre 1,7 et 2 ml de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse.

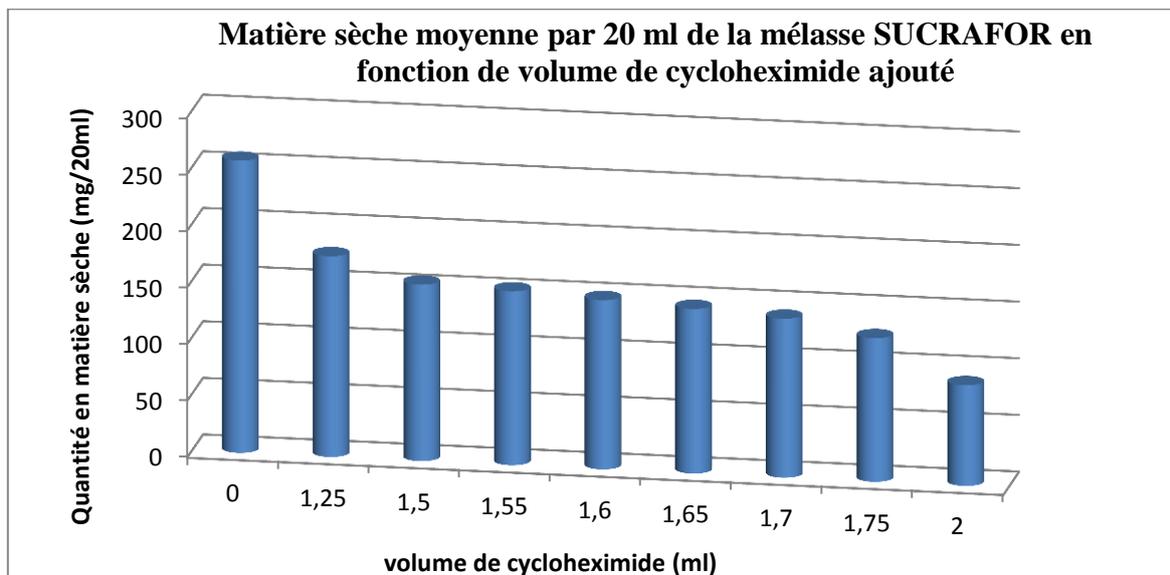
Afin de bien observer l'effet de l'inhibiteur sur le fonctionnement de la cellule, nous avons tout d'abord calculé la moyenne des quantités de matière sèche trouvées pour chaque volume de cycloheximide ajoutés sur la mélasse SUCRAFOR, puis tracer l'histogramme de sa variation en fonction de ces mêmes volumes ajoutés.

Les valeurs de la moyenne qui ont été calculées, sont consignées dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de mélasse SUCRAFOR sur la croissance cellulaire

Volume en ml de cycloheximide ajoutés sur 100 g de mélasse	0	1,25	1,50	1,55	1,60	1,65	1,70	1,75	2,00
<u>Moyenne de la quantité de la levure en matière sèche pour chaque volume de cycloheximide ajouté</u>	257,84	177,17	155,76	153,41	149,31	145,19	140,21	126,72	88,88

L'histogramme ci-après illustre l'effet de l'ajout de cycloheximide sur la quantité de la levure en MS obtenue à la fin de la fermentation:



Graph 1: Variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume de cycloheximide ajouté sur la mélasse SUCRAFOR

D'après ce graphe, on constate qu'au fur et à mesure qu'on augmente le volume de cycloheximide ajouté sur la mélasse SUCRAFOR on a une diminution de la biomasse, cela signifie une inhibition de la multiplication de la levure.

La molécule de cycloheximide agit sur le Ribosome 80S, et donc elle empêche la synthèse des protéines et par conséquent de l'enzyme (l'invertase) responsable de la dégradation du saccharose, contenue dans la mélasse, en glucose et fructose, ces dernières sont des sucres simples assimilables par la levure.

D'où un blocage de la multiplication, ce qui est illustré par la diminution de la valeur de la quantité de levure en matière sèche pour la mélasse SUCRAFOR.

Mélasse SURAC

La mélasse SURAC a subi le même test que la mélasse SUCRAFOR.

De même, nous avons travaillé avec la concentration de 0,001 g /l qui a été fixé auparavant (lors de notre étude sur la mélasse SUCRAFOR), en variant les volumes de cycloheximide ajoutés sur la mélasse SURAC.

Les résultats obtenus sur la mélasse SURAC après la lecture des absorbances sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 13 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de mélasse SURAC mesurée à différents volumes du cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Absorbance (A)</u>	0,237	0,179	0,105	0,058
	0,233	0,174	0,104	0,060
	0,235	0,179	0,104	0,052

Les valeurs de la quantité de matière sèche calculées sont regroupées dans le tableau ci-dessous:

Tableau 14 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de mélasse SURAC à différents volumes de cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de mélasse</u>	208,56	157,52	92,40	51,04
	205,04	153,12	91,52	52,80
	206,80	157,52	91,52	45,76

Les résultats du tableau montrent que le volume de 1,75 ml de cycloheximide présente une légère toxicité, correspond à la limite inférieure de toxicité (90 mg de MS).

Pour les volumes 1,25 et 1,5 ml de cycloheximide, leurs quantités de levure en mg de matière sèche sont au-dessus de la limite supérieure de toxicité (140 mg), donc ils sont non toxiques, contrairement au volume de 2 ml qui présente une forte toxicité, car sa quantité de levure en matière sèche est au-dessous de la limite inférieure (90 mg).

Il nous reste maintenant à fixer la limite supérieure de toxicité pour la mélasse SURAC, pour cela, nous avons travaillé avec des volumes de cycloheximide compris entre 1,5 et 1,75 ml d'où le choix des volumes suivants : 1,55 ; 1,6 ; 1,65 et 1,7 ml.

Les résultats qui ont été obtenus sont résumés dans le tableau 15 :

Tableau 15 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,55	1,6	1,65	1,7
<u>Absorbance (A)</u>	0,159	0,139	0,124	0,118
	0,160	0,140	0,127	0,119
	0,159	0,159	0,125	0,120

La quantité de levure en matière sèche après 17h de fermentation a été calculée, les résultats sont regroupés sur le tableau suivant :

Tableau 16 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001			
	1,55	1,6	1,65	1,7
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de mélasse</u>	139,92	122,32	109,12	103,84
	140,80	123,20	111,76	104,72
	139,92	121,44	110,00	105,60

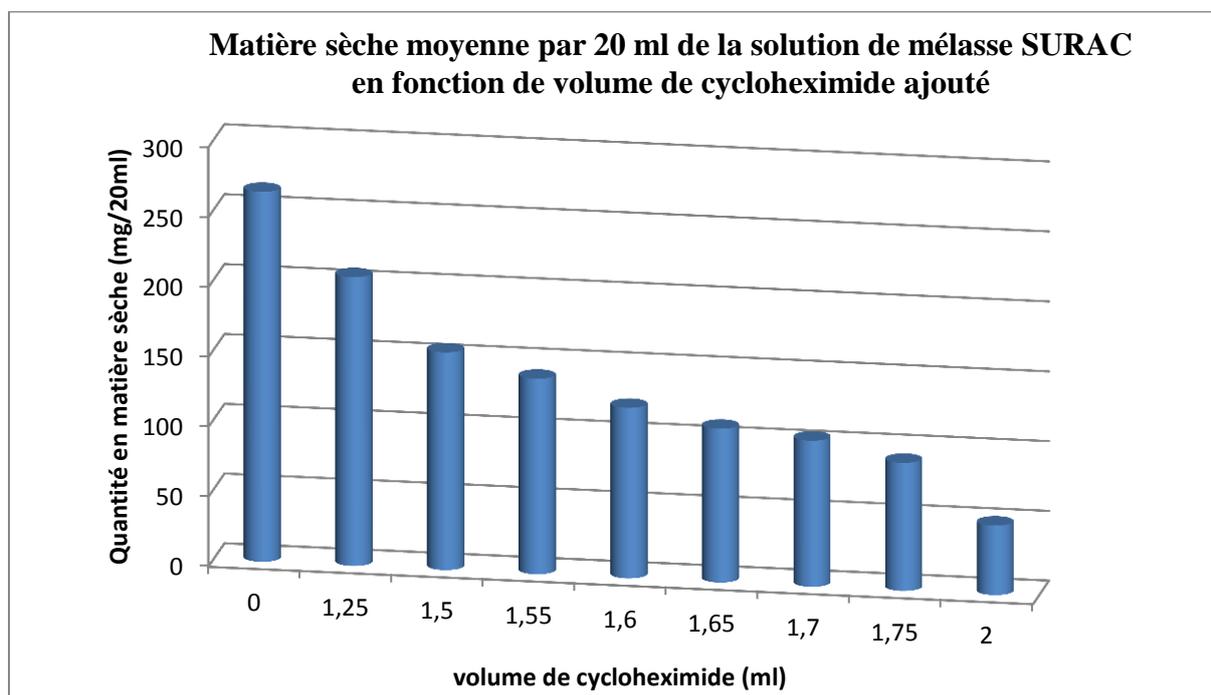
D'après ces résultats, on observe que la limite supérieure correspond au volume de 1,55 ml de cycloheximide ceux-ci est justifié par la quantité de levure en matière sèche qui est proche de 140 mg, en revanche, les autres volumes présentent une légère toxicité.

La moyenne de toutes les quantités de levure en matière sèche récoltée a été calculée pour chaque volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC, les résultats sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de mélasse SURAC sur la croissance cellulaire

volume en ml de cycloheximide ajouté a 100 g de mélasse	0	1,25	1,50	1,55	1,60	1,65	1,70	1,75	2,0
<u>Moyenne de la quantité de levure en matière sèche pour chaque volume de cycloheximide ajouté</u>	264,88	206,92	156,05	140,21	122,32	110,29	104,72	91,81	49,87

L'histogramme obtenu, nous a permis d'observer clairement l'effet de cycloheximide sur la production de la biomasse.



Graphe 2 : Variation de la quantité en matière sèche moyenne de la levure en fonction de volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC

Le graphe montre le même effet observé que dans le cas de la mélasse SUCRAFOR. En augmentant le volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC, on remarque une diminution de la quantité de la levure en matière sèche et donc un blocage de la croissance de cette dernière. Ce blocage dû à l'inhibition de la biosynthèse des enzymes responsables de l'inversion du saccharose (en glucose et fructose) ; source de nutriment pour la levure.

Mélasses SUTA

Le même test a été effectué pour la mélasse SUTA, les résultats obtenus en absorbances sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 18 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de mélasse SUTA mesurée à différents volumes du cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100g de mélasse SUTA	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Absorbance (A)</u>	0,205	0,180	0,159	0,149
	0,208	0,182	0,160	0,150
	0,205	0,180	0,159	0,151

Après lecture des absorbances, le calcul des quantités de levure en matière sèche pour chaque test, ont été effectués et les résultats sont consignés dans le tableau 19 :

Tableau 19 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUTA à différents volumes de cycloheximide ajoutés

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse SUTA	0,001			
	1,25	1,5	1,75	2
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de la mélasse</u>	180,40	158,40	139,92	131,12
	183,04	160,16	140,80	132,00
	180,40	158,40	139,92	132,88

Concernant la mélasse SUTA, on remarque que la limite supérieure ne doit pas dépasser le volume de 1,75 ml de cycloheximide.

Les deux volumes de 1,25 et 1,5 ml de cycloheximide ne présentent pas une toxicité, car leurs quantités en matière sèche sont au-dessus de la limite supérieure (140 mg), par contre le volume de 2 ml de cycloheximide est légèrement toxique car sa quantité de levure en matière sèche est comprise entre 90 et 140 mg/20 ml.

La limite inférieure de toxicité a été recherchée en travaillant avec des volumes de cycloheximide supérieurs à 2 ml.

Les résultats obtenus des absorbances sont les suivants :

Tableau 20 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001					
	1,55	1,6	1,65	1,7	2,25	2,5
<u>Absorbance (A)</u>	0,176	0,172	0,169	0,163	0,136	0,102
	0,177	0,171	0,170	0,164	0,139	0,101
	0,178	0,172	0,169	0,163	0,138	0,103

La quantité en matière sèche a été calculée à l'aide de la relation (1), dont les valeurs sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUTA à différents volumes de cycloheximide ajoutés à une concentration fixe

Concentration (g/l) et volume (ml) de cycloheximide ajouté à 100 g de mélasse	0,001					
	1,55	1,6	1,65	1,7	2,25	2,5
<u>Quantité de la levure en mg de matière sèche par 20 ml de la solution de mélasse</u>	154,88	151,36	148,72	143,44	119,68	89,76
	155,76	150,48	149,60	140,80	122,32	88,88
	156,64	151,36	148,72	143,44	121,14	89,76

Après avoir effectué le test de toxicité classique sur la mélasse SUTA, on a trouvé que la limite inférieure correspond au volume de 2,5 ml de cycloheximide.

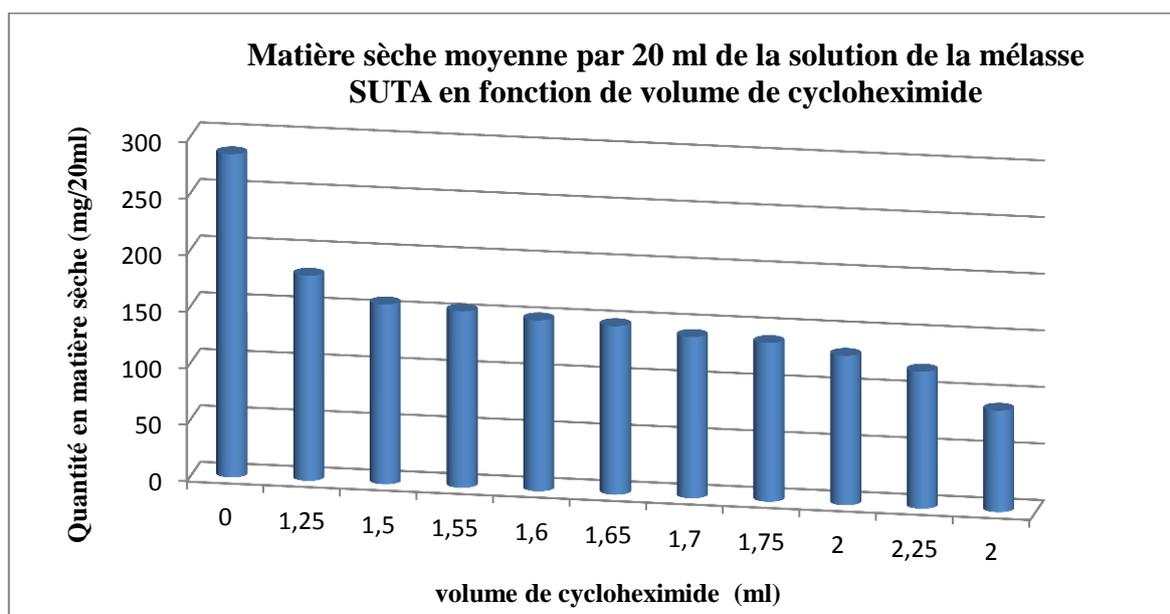
Les autres volumes sont considérés comme étant non toxiques, leurs quantités de levure en matière sèche dépassent 140 mg /20 ml.

La moyenne de toutes les quantités en matière sèche a été calculée les valeurs sont indiquées dans le tableau suivant:

Tableau 22 : impact de cycloheximide ajouté à 20 ml de la solution de la mélasse SUTA sur la croissance cellulaire

Volume en ml de cycloheximide ajouté a 100 g de mélasse	0	1,25	1,50	1,55	1,60	1,65	1,70	1,75	2,00	2,25	2,50
<u>Moyenne de la quantité de la levure en matière sèche pour chaque volume de cycloheximide</u>	285,49	181,28	158,98	155,76	151,06	149,01	142,56	140,21	132,00	121,14	89,76

Le graphe de la variation de la concentration en fonction de volume de cycloheximide pour la mélasse SUTA est le suivant :



Graph 3 : Variation de la quantité en matière sèche moyenne de la levure en fonction de volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA

Par analogie avec les deux types de mélasse SURAC et SUCRAFOR, la mélasse SUTA est présente aussi un effet négatif sur la multiplication de la levure, cela est justifié par une diminution de la quantité en matière sèche lors de l'augmentation du volume de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA.

L'inhibiteur agit de la même manière que les autres mélasses.



Conclusion de l'expérience :

- Pour cette série de mesures, on peut conclure que les trois types de mélasse utilisée au sein de la société Lesaffre Maroc ne sont pas toxiques,
- La concentration de cycloheximide qui a été fixée pour l'étude est de **0,001 %**,
- Les volumes de cycloheximide correspondent aux limites de toxicité inférieure et supérieure pour chaque type de mélasse sont résumés dans le tableau ci-dessous :

	<u>SUCRAFOR</u>	<u>SURAC</u>	<u>SUTA</u>
<u>Volume en ml de cycloheximide correspond à 140 mg en matière sèche</u>	1,70	1,55	1,75
<u>Volume en ml de cycloheximide correspond à 90 mg en matière sèche</u>	2,00	1,75	2,50

- L'existence d'un effet sur la multiplication cellulaire lors de l'utilisation de cycloheximide comme inhibiteur.

2. Méthode fermento :

Cette méthode est basée sur le calcul de volume de CO₂ dégagé au cours de la fermentation en milieu anaérobie.

Pour atteindre l'objectif de notre sujet, nous avons travaillé sur le fermentomètre afin de :

- ✚ Elaborer un mode opératoire convenable,
- ✚ Détecter l'effet de cycloheximide sur la quantité de CO₂ dégagée au cours de la fermentation,
- ✚ Trouver des nouvelles limites de toxicité définies par le volume de CO₂ dégagée en ml,
- ✚ Minimiser le temps de contrôle de toxicité de la mélasse.

La variation de CO₂ en fonction du temps au cours de cette fermentation a été définie par 3 phases: **latence**, **croissance** et **stationnaire**.

- ❖ **Une phase latence :** de durée variable au cours de laquelle la cellule s'adapte et commence à synthétiser les enzymes indispensables à l'assimilation des constituants du nouveau milieu de culture. Au cours de cette phase, il n'y a pas de reproduction cellulaire.
- ❖ **Une phase de croissance :** subdivisée en deux phases dont la première est une phase d'accélération au cours de laquelle la multiplication cellulaire démarre avec une vitesse spécifique de croissance de plus en plus grande correspondant à la consommation de sucre. Concernant la seconde, elle correspond à une multiplication binaire se faisant à vitesse constante dont la vitesse de croissance est faible au début, puis subit une forte accélération et devient rapidement importante. cela est due à la consommation presque totale des sucres.

- ❖ **Et une phase stationnaire :** c'est là où on a une stabilité de volume de CO₂ dégagé correspond à la diminution de la vitesse de transport de sucre due à la toxicité de la mélasse.

Avant de passer à la fixation des limites de toxicité par cette nouvelle méthode, nous avons tout d'abord optimisé un mode opératoire convenable qui nous a permis d'obtenir une stabilité de dégagement de CO₂ pendant un temps minime de 7h, correspond à l'assimilation totale du substrat.

Pour ce faire, nous avons varié la quantité de substrat, la levure et de l'extrait de levure pour les trois types de mélasse étudiés. Les résultats qui ont été obtenus sont résumés dans le tableau suivant pour chaque mode opératoire utilisé :

Tableau 23 : Temps de stabilité de dégagement de CO₂ à des modes opératoires différents

	Mode opératoire utilisé			
	1	2	3	4
Quantité de substrat en g	17	8	4	3
Quantité de levure en mg de MS	2,5	25	10	5
Quantité de l'extrait de levure en g	2	1	0,5	0,11
Temps de stabilité pour la mélasse SUCRAFOR (h)	17	12	9	6,5
Temps de stabilité pour la mélasse SURAC (h)	17	11	8,5	6,5
Temps de stabilité pour la mélasse SUTA (h)	17	12	9	7

Les résultats ont montré que lorsque nous avons travaillé avec les mêmes conditions de la méthode classique, nous avons eu une stabilité de dégagement de CO₂ après 17h de fermentation, donc il y a une cohérence entre la stabilité de CO₂ dégagé et la stabilité de la quantité en MS.

Pour le mode opératoire N°2, nous avons diminué la quantité de mélasse et de l'extrait de levure et augmenter la quantité de la levure en matière sèche, nous avons eu une stabilité de dégagement de CO₂ après 12h pour la mélasse SUCRAFOR et SUTA et 11h pour SURAC.

En diminuant de plus la quantité de substrat, extrait de levure ainsi que de la levure, nous avons constaté que le mode qui aboutit à une stabilité de dégagement de CO₂ pendant 7h de fermentation est le mode N°4 avec un temps de stabilité de 7h pour la mélasse SUTA et 6h30min pour les deux autres types de mélasse SUCRAFOR et SURAC.

Et donc, nous avons adopté dans le reste des tests effectuer sur le fermentomètre le mode opératoire N°4 qui correspond à :

- 3 g de mélasse,
- 0,11 g d'extrait de levure,
- 5 mg de MS de levure

Après avoir trouvé le mode opératoire adapté, nous avons utilisé les volumes de cycloheximide correspondant aux limites inférieure et supérieure de toxicité, fixés par la méthode classique, sur le fermentomètre afin d'obtenir des nouvelle limites de toxicité par le CO₂ dégagé après 7h de fermentation.

Nous avons suivi l'évolution de dégagement de CO₂ en fonction du temps en présence de cycloheximide à différents volumes et à une concentration de 0,001 g/l, fixée auparavant, pour les trois types de mélasses : SUCRAFOR, SURAC et SUTA.

Mélasse SUCRAFOR

Les résultats qui ont été trouvés pour la mélasse SUCRAFOR après 7h de fermentation sous agitation, sont indiqués dans le tableau 24 :

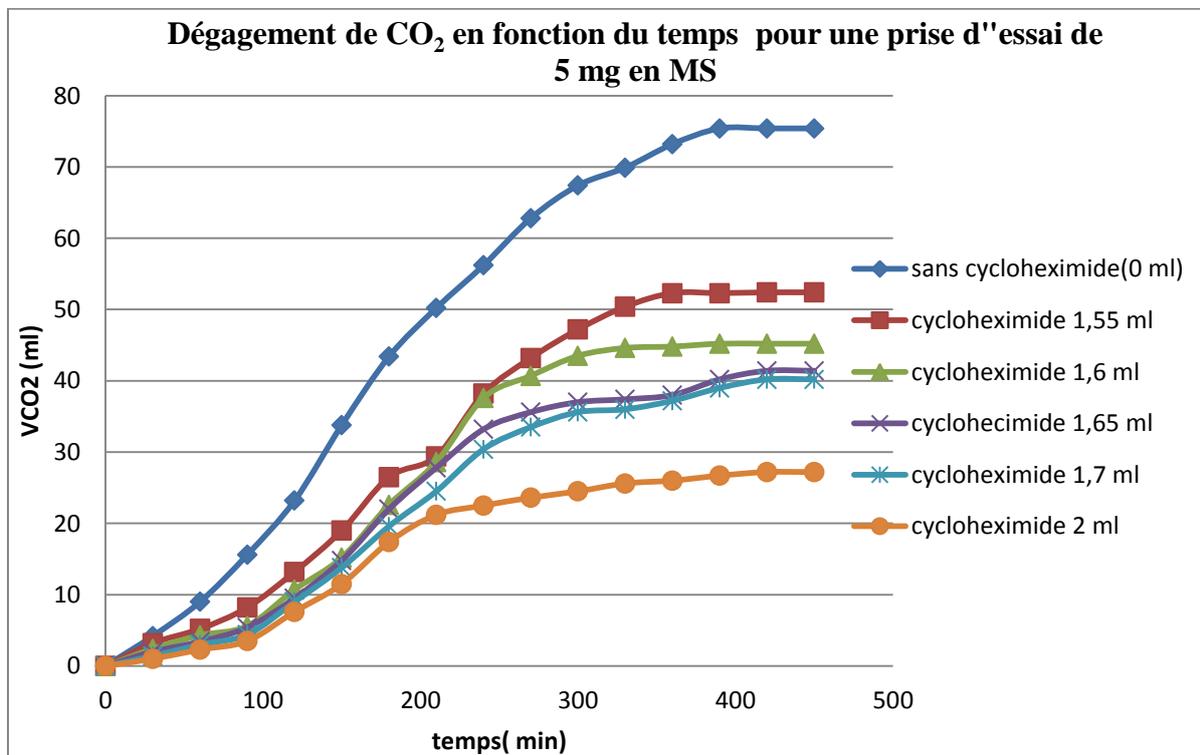
Tableau 24 : Dégagement de CO₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR

	Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100 g de la mélasse SUCRAFOR					
	0	1,55	1,6	1,65	1,7	2
Temps (min)	Volume de CO ₂ dégagé à chaque 30 min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	4,2	3,2	2,4	2,0	1,4	1,0
60	9,0	5,2	4,3	3,4	3,0	2,3
90	15,6	8,2	5,6	5,4	4,4	3,5
120	23,2	13,2	10,7	9,5	9,0	7,6
150	33,8	19,0	15,2	14,8	13,8	11,5
180	43,4	26,5	22,6	22	19,6	17,4
210	50,2	29,4	28,6	27,8	24,5	21,2
240	56,2	38,2	37,6	33,2	30,4	22,5
270	62,8	43,2	40,7	35,6	33,5	23,6
300	67,4	47,2	43,5	37,0	35,6	24,5
330	69,9	50,4	44,6	37,4	36,0	25,6
360	73,2	52,3	44,8	38,0	37,2	26,0
390	75,4	52,3	45,2	40,2	39,0	26,7
420	75,4	52,4	45,2	41,4	40,2	27,2
450	75,4	52,4	45,2	41,4	40,2	27,2

D'après l'analyse des résultats du tableau 24, nous avons observé une stabilité de dégagement de CO₂ pour tous les volumes de cycloheximide ajoutés à la mélasse SUCRAFOR à partir d'un certain temps de fermentation.

Pour les volumes 1,7 et 2 ml de cycloheximide, la stabilité de CO₂ a été observé dès la 420^{ème} min, dont les valeurs de CO₂ dégagée sont successivement **40,2 ml** et **27,2 ml**.

Le graphe ci-après, montre la variation de dégagement de CO₂ en fonction du temps et à avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SUCRAFOR pendant 7 h de fermentation en absence d'oxygène.



Graph 4 : Variation du volume de CO₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SUCRAFOR

Les trois phases citées préalablement sont clairement observable pour la courbe témoin où il y a pas de cycloheximide :

- ✓ Une phase latence qui commence à partir des premières minutes jusqu'à la 90^{ème} min, C'est le temps nécessaire à la cellule pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau milieu nutritionnel, au cours de cette phase la vitesse de dégagement de CO₂ est faible.
- ✓ Une phase de croissance située entre la 90^{ème} min et la 390^{ème} min, où le dégagement de CO₂ est maximum, les cellules sont dans un bon état physiologique et se divisent de façon exponentielle.
- ✓ Dès la 390^{ème} min, Une stabilité de dégagement de CO₂ correspond à l'épuisement des nutriments et l'accumulation de déchets toxiques (ex.: acides organiques) libérés dans le milieu. C'est ce qu'on appelle phase stationnaire.

Concernant les courbes avec existence de cycloheximide à des volumes différents, on constate que les phases de latence et de croissance ne sont pas clairement distinguées, la seule phase observable pour ces courbes est la phase stationnaire qui définit la toxicité, avec des temps de début de stabilité différents : la 420^{ème} min pour les volumes 1,55 ; 1,65 ; 1,7 et 2 ml de cycloheximide et la 390^{ème} min pour le volume de 1,6 ml.

Mélasse SURAC

Les résultats obtenus sur le fermentomètre pour la mélasse **SURAC** sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Dégagement de CO₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SURAC

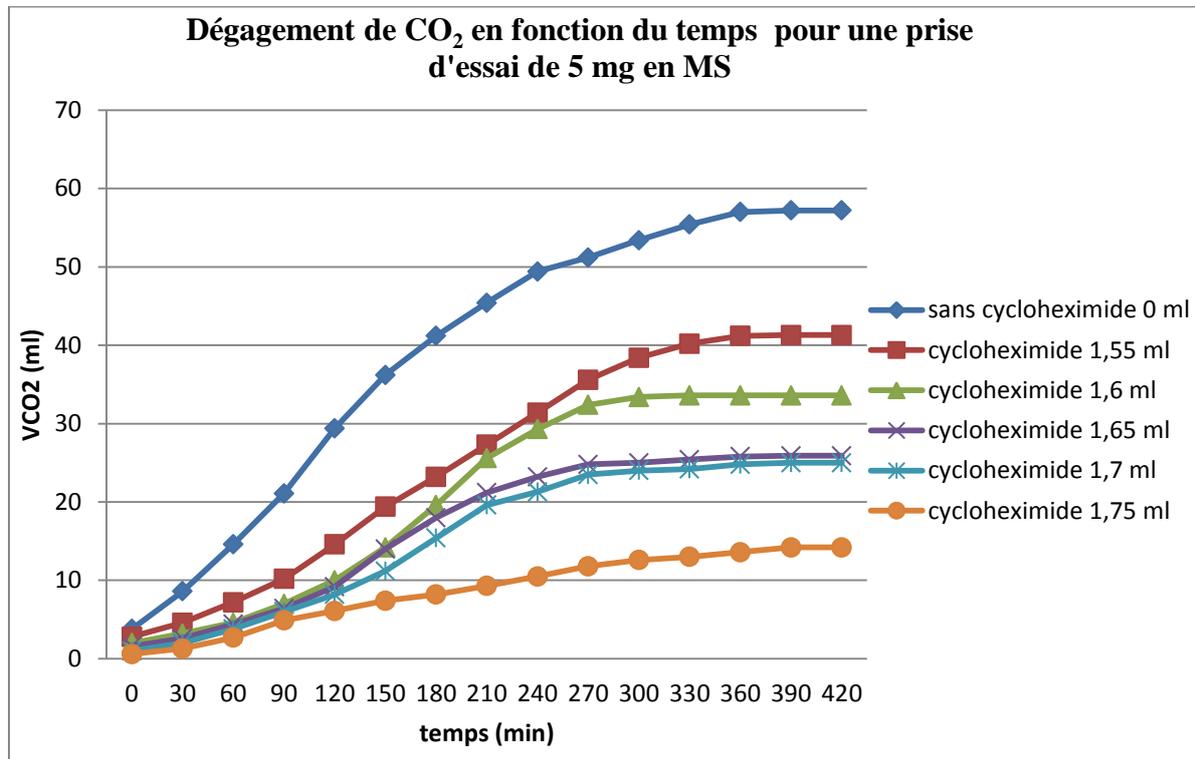
	Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100 g de la mélasse SURAC					
	0	1,55	1,6	1,65	1,7	1,75
Temps (min)	Volume de CO ₂ dégagé à chaque 30 min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	3,8	2,8	2,0	1,6	1,0	0,6
60	8,6	4,6	3,2	2,6	2,0	1,3
90	14,6	7,2	46,0	4,4	3,8	2,7
120	21,1	10,2	7,0	6,4	6,0	4,9
150	29,4	14,6	10,0	9,2	8,2	6,1
180	36,2	19,4	14,2	14,0	11,2	7,4
210	41,2	23,2	19,6	18,0	15,4	8,2
240	45,4	27,3	25,6	21,2	19,6	9,3
270	49,4	31,4	29,3	23,2	21,3	10,5
300	51,2	35,6	32,4	24,8	23,5	11,8
330	53,4	38,4	33,4	25,0	24,0	12,6
360	55,4	40,2	33,6	25,4	24,2	13,0
390	57,0	41,2	33,6	25,8	24,8	13,6
420	57,2	41,3	33,6	25,9	25,0	14,2
450	57,2	41,3	33,6	25,9	25,0	14,2

D'après les résultats obtenus sur le fermentomètre, on constate que le temps de début de stabilité de volume de CO₂ dégagé est différent pour chaque volume de cycloheximide ajouté.

Concernant le volume de 1,55 ml de cycloheximide, la stabilité de dégagement de CO₂ commence à partir de 420^{ème} min avec un volume de CO₂ de **41,3 ml**.

Une stabilité a été observée dès la 420^{ème} min pour le volume de cycloheximide de 1,75 ml avec un dégagement de CO₂ de **14,2 ml**.

A partir de tableau 25, nous avons tracé le graphe de la variation de CO₂ dégagé en fonction du temps à différents volumes de cycloheximide ajoutés à la mélasse SURAC



Graph 5 : Variation du volume de CO₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SURAC

Le graphe montre :

La même allure observée pour la courbe témoin de la mélasse SUCRAFOR, avec toujours existence des trois phases citées auparavant et avec un temps de début de stabilité qui commence dès la 420^{ème} min.

Une grande phase stationnaire a été observée pour les courbes avec cycloheximide, due à la toxicité du milieu nutritif ce qui empêche la formation de l'invertase ; enzyme responsable de dégradation de saccharose en glucose et fructose.

Le temps de début de stabilité commence à partir de la 420^{ème} min pour les volumes : 1,55 ; 1,65 ; 1,7 et 1,75 ml de cycloheximide et la 360^{ème} min pour le volume de 1,6 ml.

Mélasse SUTA

Concernant la mélasse **SUTA**, les résultats qui ont été obtenus sur le fermentomètre sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 26 : Dégagement de CO₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse **SUTA**

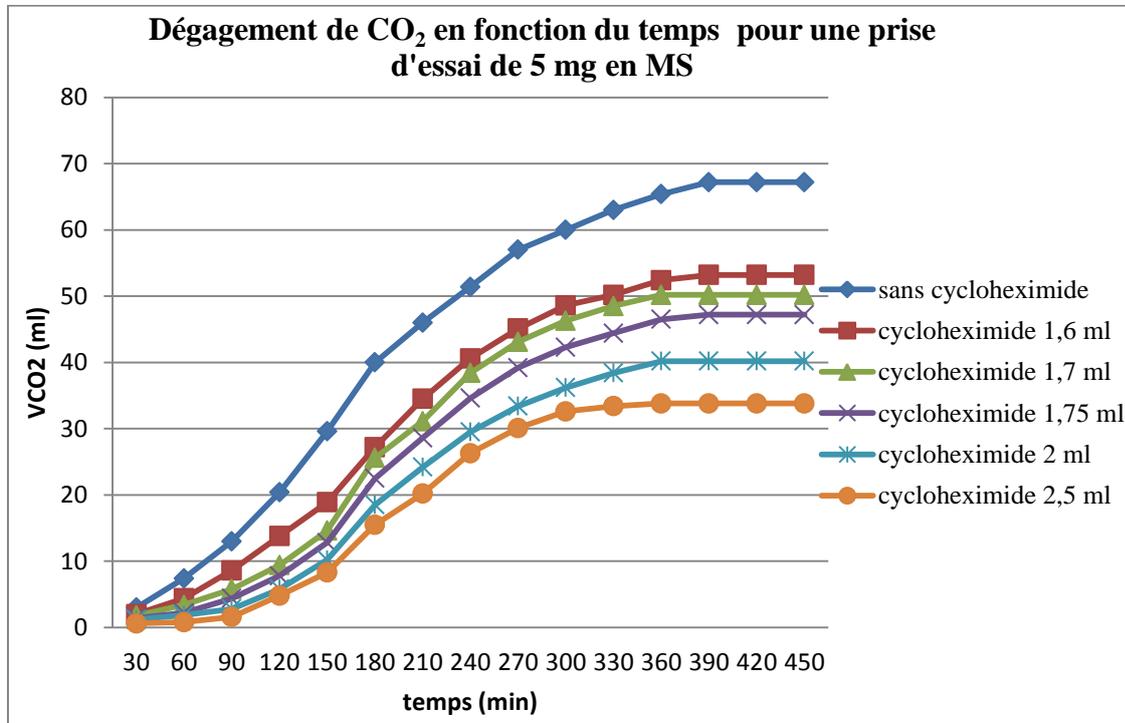
	Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100 g de la mélasse SUTA					
	0	1,6	1,7	1,75	2	2,5
Temps (min)	Volume de CO ₂ dégagé à chaque 30 min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	3,0	2,0	1,8	1,4	1,2	0,6
60	7,4	4,4	3,4	2,2	1,87	0,8
90	13,0	8,6	5,8	4,4	2,8	1,6
120	20,4	13,8	9,4	7,8	5,8	4,8
150	29,6	18,9	14,6	12,8	10,2	8,3
180	40,0	27,2	25,6	22,5	18,5	15,5
210	46,0	34,5	31,12	28,6	24,2	20,2
240	51,4	40,6	38,4	34,6	29,5	26,3
270	57,0	45,1	43,1	39,2	33,4	30,1
300	60,0	48,6	46,3	42,3	36,2	32,6
330	63,0	50,2	48,5	44,4	38,4	33,4
360	65,4	52,4	50,2	46,5	40,2	33,8
390	67,2	53,2	50,2	47,2	40,2	33,8
420	67,2	53,2	50,2	47,2	40,2	33,8
450	67,2	53,2	50,2	47,2	40,2	33,8

D'après l'analyse des résultats du tableau 26, on remarque que les temps de début de stabilité du dégagement de CO₂ sont distincts pour chacun des volumes de cycloheximide ajoutés à la mélasse SUTA. C'est ce que nous avons déjà observé pour les deux autres types de mélasse SUCRAFOR et SURAC.

Le volume de 1,75 ml de cycloheximide correspond à un temps de début de stabilité à partir de la 390^{ème} min avec un volume de CO₂ de **47,2 ml**, quant au volume de 2,5 ml de

cycloheximide, il correspond à un dégagement de CO₂ de **33,8 ml** avec une stabilité dès la 360^{ème} min.

Le graphe de la variation de CO₂ en fonction du temps et à différent volume de cycloheximide pour la mélasse SUTA a été montrer ci-dessous :



Graph 6 : Variation du volume de CO₂ dégagé en fonction du temps et avec différents volumes de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA

L'analyse de graphe de la mélasse SUTA montre les mêmes conclusions obtenues pour les deux autres types de mélasse SUCRAFOR et SURAC.

La phase stationnaire commence dès la 360^{ème} min pour les volumes 1,7 ; 2 et 2,5 ml de cycloheximide et à partir de la 390^{ème} min pour les volumes 1,6 et 1,75 ml de cycloheximide ajouté à la mélasse SUTA.

➔ Conclusion de l'expérience :

D'après tous les tests que nous avons effectués par la méthode fermento on est arrivé aux conclusions suivantes :

- ✓ Une large phase stationnaire a été observée pour les courbes avec cycloheximide.
- ✓ Présence des trois phases : latence, croissance et stationnaire pour la courbe sans cycloheximide.

- ✓ Les limites de toxicité par le dégagement de CO₂ pour chaque mélasse étudiée sont résumées dans le tableau suivant :

	SUCRAFOR	SURAC	SUTA
<u>Limite inférieure</u>	27,2	14,2	38,8
<u>Limite supérieure</u>	40,2	41,2	47,2

- ✓ Pour généraliser notre méthode, nous avons choisi parmi ces valeurs trouvées pour les trois types de mélasse étudiées, la valeur maximale et la valeur minimale et donc les nouvelles limites de toxicité définissant cette nouvelle méthode sont :

- ✚ Limite inférieure : 14,2 ml
- ✚ Limite supérieurs : 47,2 ml

II. Test des ions ammoniums quaternaires :

Les ammoniums quaternaires sont des inhibiteurs très toxiques, quand ils sont présentés à des concentrations plus élevées dans la mélasse ils peuvent entraîner des effets néfastes sur la multiplication de la levure. C'est la raison pour laquelle nous avons effectué le test des ions ammonium quaternaire qui a pour but de vérifier qualitativement la présence où l'absence de ces ions dans la mélasse.

Tout d'abord, le test a été effectué sur les trois types de mélasses utilisé dans l'industrie levurière : SUCRAFOR, SURAC et SUTA. Les résultats du test sont illustrés par les figures suivantes :



Figure 7 : Résultat du test sur la mélasse surac (mélasse de canne à sucre)



Figure 8 : Résultats du test sur les mélasses sucrafor et suta (mélasses de betterave)

D'après le laboratoire de recherche de la CILE, la formation d'un anneau légèrement rose, moyennement rose ou très rose au sommet du tube à essai montre que la mélasse contient peu, moyennement ou trop d'ammonium quaternaire, cela signifie que la quantité de ces dernière est supérieur à 5 ppm. La formation d'un anneau transparent ou jaune est due à l'absence d'ammonium quaternaire.

Les résultats obtenus pour les trois types de mélasses montrent que :

- ❖ la mélasse SURAC contient les ions ammoniums quaternaires, ceci est confirmé par la présence d'une coloration légèrement rose au sommet du tube à essai, d'où la quantité des ions ammoniums est supérieure à 5ppm.
- ❖ L'absence des ions ammoniums quaternaires dans les mélasses SUCRAFOR et SUTA, s'explique par un anneau transparent ou jaune au sommet des tubes à essai.

L'existence d'ammonium quaternaire dans la mélasse **SURAC**, peut provenir de plusieurs sources :

- les détergents utilisés pour le lavage et le nettoyage des cuves de stockage de la mélasse,
- les pesticides utilisés dans l'agriculture,
- ou lors du traitement effectué sur la mélasse dans l'industrie sucrrière...

La principale source de contamination de la mélasse au sein de la société Lesaffre Maroc est les détergents.

Pour cela nous avons appliqué notre étude sur les différents détergents de type : topax, stabimix et P3 utilisés au moment de lavage des fermenteurs et les cuves de stockage de la mélasse afin de vérifier :

- Leurs effets sur la génération cellulaire, en s'appuyant sur la nouvelle méthode dite «fermento» (dégagement de CO₂) et la méthode Classique (biomasse),
- Leurs degrés de toxicité l'une par rapport à l'autre.

Nous avons opté de travailler sur une mélasse ne contenant pas des ions ammoniums quaternaires qui est SUCRAFOR.

1) Test de toxicité classique :

Les résultats sont regroupés sur le tableau suivant:

Tableau 27 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de détergents

Type de détergent	Sans détergent	Topax		Stabimix		P3	
	0	1	5	1	5	1	5
Volume en ml de détergents ajouté à 100 g de mélasse							
<u>Absorbance (A)</u>	0,341	0,024	0,019	0,292	0,020	0,022	0,013
	0,340	0,023	0,018	0,291	0,021	0,023	0,013
	0,340	0,024	0,019	0,292	0,021	0,022	0,012

La quantité en matière sèche pour les absorbances obtenue a été calculé dont les valeurs sont indiquée dans le tableau 28 :

Tableau 28 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR avec différents détergent et à différents volumes

Type de détergent	Sans détergent	Topax		Stabimix		P3	
	0	1	5	1	5	1	5
Volume en ml de détergents ajouté à 100 g de mélasse							
<u>Quantité de levure en matière sèche (mg/20 ml)</u>	300,08	21,12	16,72	256,96	17,60	19,36	11,44
	299,20	20,24	15,84	256,08	18,48	20,24	11,44
	299,20	21,12	16,72	256,96	18,48	19,36	10,56

D'après les résultats cités dans le tableau 28, nous avons remarqué que :

- ✓ les deux types de détergents topax et P3 ont un effet sur la multiplication même à un volume de 1 ml, contrairement à stabimix qui ne présente pas une toxicité observable au même volume (1 ml),
- ✓ avec un volume de 5 ml, les trois types de détergents ont un effet sur la croissance de la levure, ce qui est confirmé par leurs quantités en matière sèche récoltée après la fermentation.

Donc, nous avons tiré comme conclusion que le meilleur détergent qui devrait être utilisé est le stabimix.

2) Test fermento :

Ce test a pour but principal la confirmation des résultats qui ont été obtenus par la méthode classique.

Nous avons utilisé les mêmes volumes de détergents que précédemment, les résultats sont motionnés dans le tableau suivant :

Tableau 29 : Dégagement de CO₂ pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse **SUCRAFOR** à différents type de détergents

<i>Type de détergent</i>							
	<i>Sans détergent</i>	<i>Topax</i>		<i>stabimix</i>		<i>p3</i>	
	<u>Volume en ml de détergent ajoute à 100 g de mélasse</u>						
	0	1	5	1	5	1	5
Temps (min)	<u>Volume de CO₂ dégagé à chaque 15 min pendant 7h de fermentation</u>						
0	0	0	0	0	0	0	0
15	3,4	1,4	1,0	3,1	2,2	2,0	1,4
30	4,2	1,8	1,2	4,1	3,6	2,4	2,0
45	6,4	2,6	1,3	5,8	4,0	3,4	2,0
60	8,8	3,0	1,4	8,4	6,0	3,6	2,0
75	12,6	3,6	1,4	11,8	6,5	4,0	2,0
90	18,6	4,8	1,4	17,6	7,0	5,0	2,0
105	19,8	6,2	1,4	19,2	7,2	5,6	2,4
120	22,0	7,8	1,4	21,8	7,2	6,4	2,4
135	27,4	8,2	1,4	26,5	7,2	7,2	2,4
150	33,2	9,8	1,4	32,8	7,2	9,2	2,4
165	38,2	10,6	1,4	36,4	7,2	11,0	2,4
180	44,0	12,6	1,4	43,0	7,2	11,2	2,4

Pour les trois types de détergents étudiés, nous avons constaté qu'il y a un blocage très puissant lorsque nous avons travaillé avec un volume de 5 ml; dès la 30^{ème} min pour p3, 60^{ème} min pour topax et 105^{ème} min pour stabimix, ceci est due à la forte concentration d'ammonium quaternaire existant dans 5 ml de détergents.

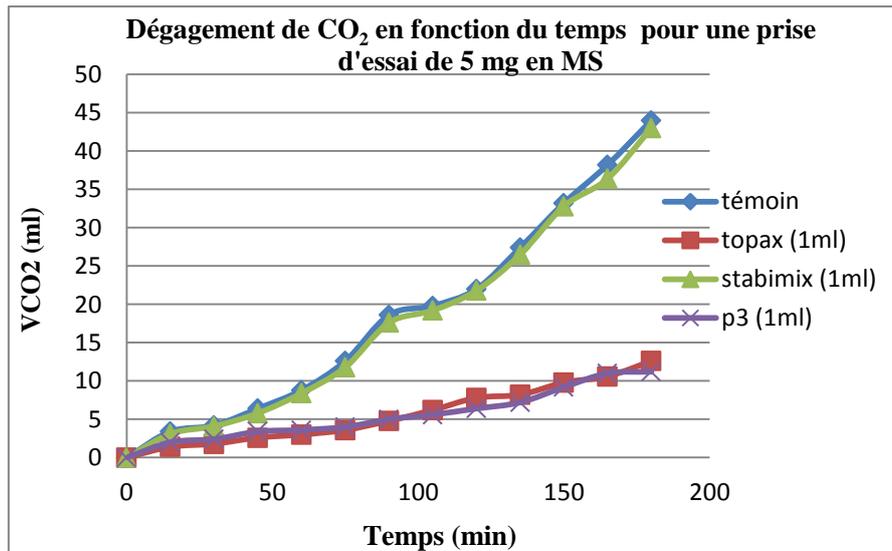
Or, pour un volume de 1 ml nous avons observé que le P3 est le plus toxique des détergents utilisés correspond à un dégagement de CO₂ de 11,2 ml, suivie de topax avec un dégagement

de CO₂ de 12,6 ml et un dégagement de CO₂ plus élevé de 43 ml pour stabimix ce qui implique la non-toxicité de ce dernier.

Ces résultats trouvés sur le fermentomètre sont cohérents avec les résultats de la méthode classique.

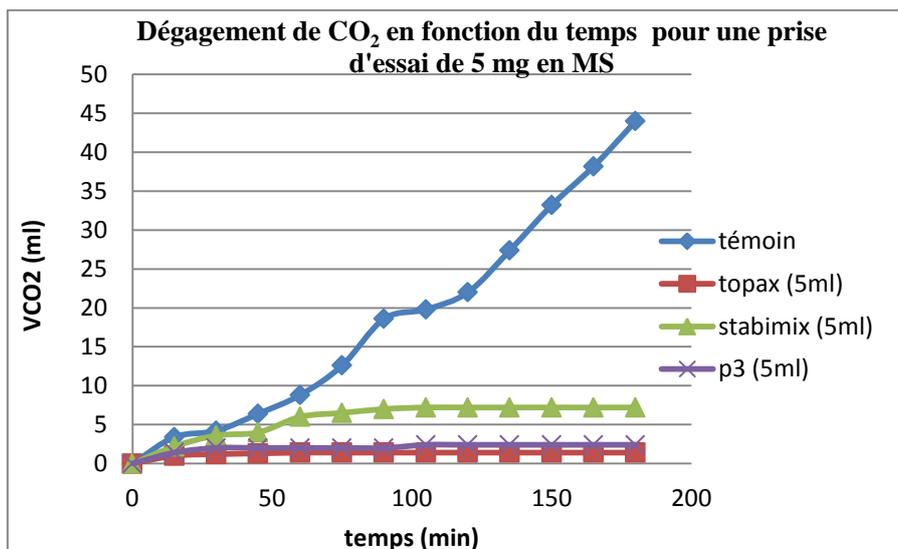
Les graphes de la variation de CO₂ en fonction du temps ont été tracés pour chaque volume de détergent :

✓ **Pour 1 ml de détergente :**



Graph 7 : Variation du volume de CO₂ dégagé en fonction du temps avec différents types de détergents à un volume de 1 ml

✓ **Pour 5 ml de détergente**



Graph 8 : Variation de dégagement de CO₂ en fonction du temps avec différentes types de détergents à un volume de 5 ml

Les graphes montrent :

Les trois détergents utilisés avec un volume de 5 ml entraînent un blocage de la croissance dès le début de la première phase quand la cellule commence à s'adapter à son milieu nutritionnel. Ces allures présentent une phase stationnaire plus large que celle du témoin avec absence de la phase de croissance.

Pour le volume de 1 ml, stabimix ne présente pas une toxicité observable et sa courbe est presque confondue avec la courbe témoin avec l'existence des trois phases citée préalablement. Par contre, pour les deux autres détergents nous avons constaté l'absence de la phase de croissance, avec une vitesse de dégagement de CO₂ plus faible.

III. Influence de quelques inhibiteurs sur l'activité enzymatique :

La mélasse contient des inhibiteurs très variés provoquant un effet sur la multiplication de la levure ce qui bloque sa capacité de synthétiser l'enzyme responsable à la dégradation de saccharose qui est l'invertase.

L'invertase présente une affinité forte pour le saccharose (beta-fructofuranoside). Néanmoins, elle peut hydrolyser d'autres fructofuranosides comme le raffinose (triholoside constitué de galactose, glucose et fructose).

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet du sulfate de cuivre (CuSO_4) sur l'activité enzymatique de l'invertase de la levure de boulangerie. Cette inhibition est liée à l'affinité que présente Cu^{2+} envers les groupes sulfhydrile des acides aminés cystéines et méthionine de l'enzyme, ainsi que l'effet de Pb^{2+} qui touche les histidines présentes dans la chaîne latérale de celle-ci ce qui provoque leur inactivation. Un autre inhibiteur à étudier c'est le bisulfite.

1. Test de toxicité classique

Les résultats qui ont été obtenus par la méthode classique pour les différents inhibiteurs à différents volumes sont indiqués dans le tableau suivant :

Tableau 30 : Absorbance d'une prise d'essai de 2,5 mg de MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR mesurée après 17h de fermentation à différents volumes d'inhibiteur

L'inhibiteur utilisé	Sans	$(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$. $\text{Pb}(\text{OH})_2$			CuSO_4			$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$		
Volume en ml ajouté a 100 g de mélasse	0	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3
<u>Absorbance (A)</u>	0,324	0,245	0,206	0,186	0,210	0,196	0,124	0,187	0,106	0,096
	0,322	0,243	0,207	0,185	0,209	0,197	0,124	0,186	0,105	0,099
	0,324	0,244	0,205	0,183	0,210	0,195	0,122	0,187	0,106	0,098

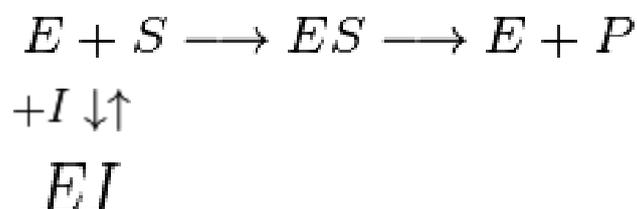
La quantité en MS a été calculée par la relation (1) citée en page 19, dont les valeurs sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 31 : Matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes d'inhibiteur ajouté

L'inhibiteur utilisé	Sans inhibiteur	$(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb}$. $\text{Pb}(\text{OH})_2$			CuSO_4			$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$		
Volume en ml ajouté a 100 g de mélasse	0	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3
<u>Quantité de levure en matière sèche (mg/20ml)</u>	285,12	215,6	181,28	163,68	184,80	172,48	109,12	164,56	93,28	84,48
	283,36	213,84	182,16	162,80	183,92	173,36	109,12	163,68	92,40	87,12
	285,12	214,72	180,40	161,04	184,80	171,60	107,36	164,56	93,28	86,24

L'influence de $S_2O_5^{2-}$ et Cu^{2+} sur l'activité enzymatique est très intense, cependant, le Pb^{2+} n'exerce pas une influence observable sur la croissance de la levure.

Le Cu^{2+} est un inhibiteur réversible de l'invertase, il a pour effet de diminuer la vitesse maximale de la réaction et de changer l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat. C'est un inhibiteur de type compétitif agit selon la réaction suivant :



2. Test fermento :

De même, nous avons effectué le même test de toxicité, mais cette fois-ci par la nouvelle méthode. Les résultats qui ont été obtenus sont motionnés dans le tableau 32 :

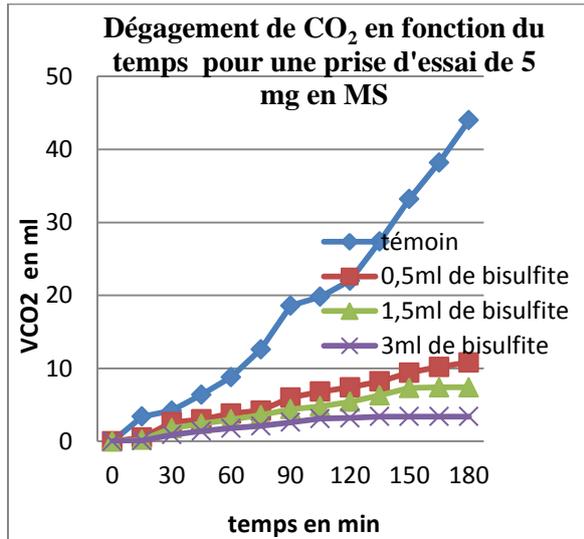
Tableau 32 : Dégagement de CO_2 pour une prise d'essai de 5 mg en MS par 20 ml de la solution de la mélasse SUCRAFOR à différents volumes de l'inhibiteur

L'inhibiteur utilisé										
	Sans inhibiteur	$Na_2S_2O_5$			$CuSO_4$			$(CH_3CO_2)_2Pb. Pb(OH)_2$		
	Volume en ml des différents l'inhibiteur									
	0	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3
Temps (min)	Volume de CO_2 dégagé à chaque 15 min pendant 7h de fermentation									
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	3,4	0,5	0,2	0,1	2,0	1,6	0,8	3,0	2,4	2,0
30	4,2	2,6	1,8	0,9	3,6	2,6	1,2	3,9	2,8	2,6
45	6,4	3,0	2,4	1,4	4,8	3,8	2,2	5,6	4,8	4,6
60	8,8	3,8	3,0	1,8	5,6	4,2	2,9	7,8	6,2	5,8
75	12,6	4,2	3,6	2,1	7,4	5,2	3,6	11,8	9,4	8,6
90	18,6	6	4,4	2,6	8,8	6,4	4,2	16,5	14,5	13,4
105	19,8	6,8	4,8	3,1	10,6	7,8	5,0	17,8	16,5	15,8
120	22,0	7,4	5,4	3,2	11,8	8,6	5,6	21,0	19,2	17,4
135	27,4	8,2	6,3	3,4	13,0	10,4	6,2	25,6	22,4	20,2
150	33,2	9,4	7,3	3,4	13,9	11,4	6,4	30,2	28,6	22,4
165	38,2	10,2	7,4	3,4	14,6	12,8	6,8	34,6	32,4	27,5
180	44	10,8	7,4	3,4	15,7	14,6	7,0	40,2	38,6	34,6

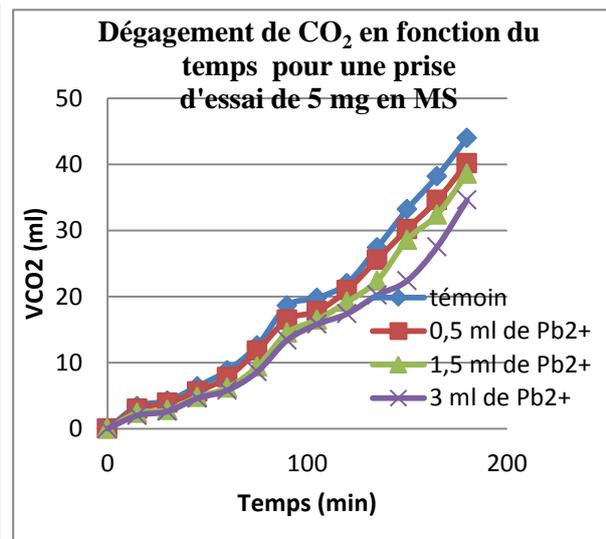
D'après les résultats cités dans le tableau, nous avons constaté que le bisulfite et le plomb(II) ont un effet sur le métabolisme cellulaire ce qui s'explique par une faible vitesse de dégagement de CO₂, contrairement au cuivre(II) qui ne présente aucun impacte observable.

Ces résultats trouvés par la méthode fermento sont cohérents avec les résultats obtenus par la méthode classique.

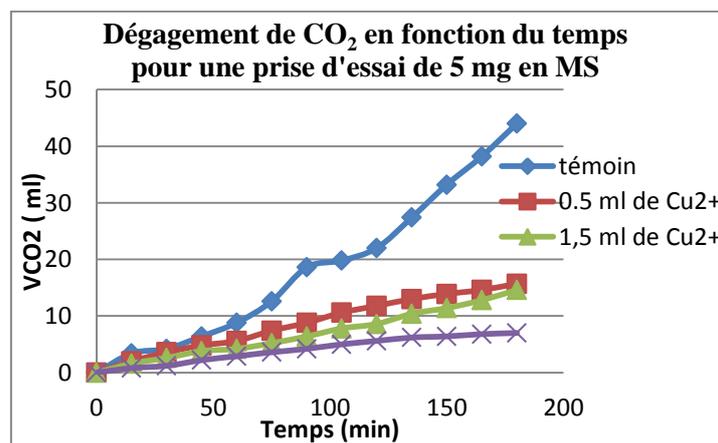
Les graphes ci-après montrent la variation de dégagement de CO₂ en fonction du temps pour chaque inhibiteur utilisé :



Graph 9 : Variation de CO₂ en fonction du temps (bisulfite)



Graph 10 : Variation de CO₂ en fonction du temps (Pb²⁺)



Graph 11 : Variation de CO₂ en fonction du temps (Cu²⁺)

D'après ces graphes, nous avons arrivé aux conclusions obtenues par les deux méthodes précédentes, les courbes de bisulfite et de cuivre(II) présentent une phase stationnaire plus grande que la courbe de plomb(II) ceci due au blocage de la multiplication cellulaire et à la forte toxicité de ces deux inhibiteurs par rapport au plomb (II).

Conclusion

Une nouvelle méthode d'évaluation de la toxicité de la mélasse est acquise pour l'entreprise.

Au terme de ce travail, l'évolution du dégagement de CO₂ par la méthode fermentaire a été la même pour les mélasses toxiques. Ceci s'explique par la stabilité de dégagement de CO₂ après un certain temps de croissance, cette stabilité montre l'effet de la toxicité sur le pouvoir fermentatif de la levure et par conséquent blocage de la multiplication.

De plus, les détergents utilisés au sein de la société LESAFFRE Maroc, sont des sources de contamination de la mélasse, basés sur les ions ammoniums quaternaires provoquant la toxicité.

Les conclusions suivantes ont été dégagées :

- ✚ La stabilité du dégagement de CO₂ s'effectue pendant 7h de fermentation au lieu de 17h pour un mode opératoire contenant 3 g de mélasse, 0,11 g d'extrait de levure et 5 mg de la levure en matière sèche.
- ✚ Des nouvelles limites de toxicité inférieure (90 mg de MS) et supérieure (140 mg de MS) ont été déterminées pour le volume de CO₂ dégagé pendant 7h de fermentation qui sont respectivement **14,2 ml** et **47,2 ml**,
- ✚ Le stabimix est le seul parmi les deux autres détergents P3 et Topax qui ne provoque pas une toxicité, donc il est préférable de l'utiliser pour le lavage des fermenteurs et des cuves de stockage de la mélasse.
- ✚ Le bisulfite s'avère le plus toxique des trois inhibiteurs étudiés, provoque une influence sur l'activité enzymatique de la levure.

Conclusion générale et perspectives

Lesaffre Maroc s'inscrit dans des travaux de recherche afin d'économiser le temps comme on le dit «TIME IS MONEY», avoir une bonne qualité et satisfaire son client. C'est pourquoi elle développe en interne les capacités nécessaires pour offrir des produits de qualité constante.

Au terme de ce stage, l'évaluation de la toxicité de la mélasse est l'une des principales priorités de la société Lesaffre Maroc, c'est pourquoi nous avons élaboré une nouvelle méthode de contrôle de toxicité avec un temps de 7h au lieu de 17h. c'est un gain du temps pour la société.

Les analyses effectuées sur les détergents ont montrées que ces derniers constituent une source de contamination de la mélasse et dont les résultats s'avèrent être déterminants.

Ces travaux méritent d'être approfondis afin de vérifier l'efficacité de toutes les mesures proposées.

A la lumière de ces analyses, le bilan de ce stage s'avère extrêmement positif, car il nous a permis de perfectionner et de confronter nos connaissances théoriques à celle pratiques, les relations interpersonnelles, une méthode de travail et de la discipline de soi.

Ce stage nous a permis d'améliorer nos connaissances tant qu'expérimentales que théoriques.

Perspectives :

Dans le temps alloué à ce travail de recherche, plusieurs approfondissements et développements n'ont pu être réalisés :

- ✚ valider définitivement les résultats obtenus au cours de cette étude,
- ✚ Approfondir la recherche en variant d'autres paramètres,
- ✚ Minimiser de plus le temps de contrôle de toxicité à 2h au lieu de 7h, ceci nécessite l'élaboration d'un nouveau mode opératoire.

Références bibliographique

- ✓ BOURAS Hanane, Bourega Asma et Khineche Saida «Influence des facteurs physiologique et nutritionnels sur la production de la biomasse (levure boulanger) » Mémoire de master de la Faculté Des Sciences et Sciences de l'ingénieur, Université de KASDI MERBAH-Ouargla, 2006, page 18 et 19, Algérie.
- ✓ HENCKÉ Stéphanie «Utilisation alimentaire des levures» thèse de doctorat de l'université HENRI POINCARÉ - NANCY I, Faculté de pharmacie, 2000, page 6 ,29 ,30 ; France.
- ✓ LOIEZ Annie, «Production de la levure de panification par biotechnologie-la levure *saccharomyces cerevisiae*», 2003, dans ' *techniques de l'ingénieur* '.Bio, Bioprocédés, vol Bio 2 (Trimestrielle).
- ✓ MOURET Jean-Roch «Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes » thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées, 2006, de Toulouse