



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:**

**Ilham Bouquadida**

**Encadré par:**

- Pr. CHAKROUNE SAID
- Mr. BOUQUADIDA ABDELALI

**Soutenu Le 15 juin 2016 devant le jury composé de:**

- **Pr. Youssef Kandri Rodi (FST Fès)**
- **Pr. Ahmed Boulahna (FST Fès)**
- **Pr. Said Chakroune (FST Fès)**
- **Mr. Abdelali Bouquadida (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: Bouquadida Ilham**

**Année Universitaire : 2015/2016**

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

### Résumé

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

Profitant de leur expertise et dans un souci du gain du temps et fournir aux consommateurs des produits sains, satisfaisant leurs besoins, j'ai soumis le sujet intitulé : « **mise en place d'une nouvelle méthode d'identification des mélasses toxiques** » au service qualité en charge de mon stage. Pendant toute la période de stage, le travail a été séquencé d'abord de trouver un mode opératoire adéquat pour la nouvelle méthode dite fermento et fixer un intervalle de toxicité définie par la stabilité du volume de CO<sub>2</sub> dégagé en s'appuyant sur l'ancienne méthode définie par la stabilité de biomasse. Pour cela il a fallu d'évaluer la non toxicité des différent mélasse soit la canne à sucre soit la betterave par la suite, l'ajout de cycloheximide à différent volume à une concentration bien déterminer nous a permis de fixer les limite de toxicité par cette nouvelle méthode et par conséquent détecter l'effet des différent élément nuisible sur l'activité enzymatique.

L'objectif de l'entreprise étant d'arriver à une nouvelle méthode de mesure de toxicité afin de tapisser les blocages inaperçus à la première heure de fermentation.

**Mots clés: nouvelle méthode, mélasse, toxicité, levure, saccharose, ammoniums quaternaires,**

**Inhibiteur**



## DÉDICACES



Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec lesquelles j'ai

### **Tout partagé :**

#### **A mes très chers parents :**

Je leur présente mon travail si modeste, mais qui sera certes un premier pas pour leur rendre

Hommage et les remercier pour leurs grands efforts accomplis à mon égard.

Que Dieu les récompense et leur prête bonne santé et longue vie.

#### **A mes chers frères:**

Vous, qui êtes à mes côtés, pour partager mes joies. Je vous souhaite une vie comblée et toute la

Réussite

#### **A mes collègues :**

A toute la promotion MST chimie des molécules bioactifs 2015/2016, je vous

Souhaite une bonne continuation dans votre vie personnelle ainsi que professionnelle

## **REMERCIEMENTS**

Avant tout développement sur cette expérience professionnelle, il apparaît opportun de commencer ce rapport de stage par des remerciements, à ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage, et même à ceux qui ont eu la gentillesse de faire de ce stage un moment très profitable.

Je tiens d'abord à rendre grâce à Dieu pour la vie, la Santé et la Force qu'il m'a accordée pour pouvoir parfaire ce travail

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr le Directeur de la société LESAFFRE MAROC pour m'avoir accepté comme stagiaire.

Je tiens aussi à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'ils m'ont fait vivre durant ces quatre mois :

J'adresse mes plus vifs remerciements au **Pr. SAID CHAKROUNE** pour le suivi qu'il a apporté à mon stage, ses conseils, ses explications, sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport. Merci à tous les membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail.

**Mr Ali BENNANI** le responsable du service laboratoire à la société LESAFFRE MAROC pour son accueil, son encadrement, et sa disponibilité.

**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.

Je remercie l'ensemble des employés de la société LESAFFRE MAROC pour les conseils qu'ils ont pu me prodiguer au cours de cette période.



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Compositions des levures-aliment	3
Tableau 2	composition moyenne des mélasses de betterave et de canne à sucre en % massique.	7
Tableau 3	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrador mesurée après 17h de fermentation en absence du cycloheximide.	22
Tableau 4	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par un volume de 20ml de la solution de la mélasse sucrador en absence du cycloheximide.	22
Tableau 5	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrador mesurée après 17h de fermentation à différent concentration de cycloheximide.	23
Tableau 6	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrador à différent concentration du cycloheximide.	23
Tableau 7	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrador mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	24
Tableau 8	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrador à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	24
Tableau 9	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrador mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	25
Tableau 10	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrador à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001% .	25
Tableau 11	impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse sucrador sur la croissance cellulaire.	26
Tableau 12	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse surac mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	27
Tableau 13	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse surac à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	27
Tableau 14	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse surac mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	28
Tableau 15	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par de 20ml de la solution de la mélasse surac à différent volume du cycloheximide à une concentration de 0.001% .	28
Tableau 16	impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse surac sur la croissance cellulaire.	29
Tableau 17	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse suta mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	30

Tableau 18	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse de la solution de la mélasse suta à différent volume du cycloheximide à une concentration de 0.001%.	30
Tableau 19	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse suta mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.	31
Tableau 20	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse suta à différent volume du cycloheximide à une concentration de 0.001%.	31
Tableau 21	impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse suta sur la croissance cellulaire.	31
Tableau 22	relevé d'évaluation de stabilité de volume de CO <sub>2</sub> par les différents modes opératoire.	33
Tableau 23	dégagement de CO <sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de mélasse sucrafor	34
Tableau 24	dégagement de CO <sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse surac.	37
Tableau 25	dégagement de CO <sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse suta.	39
Tableau 26	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor mesurée après 17h de fermentation à différent volume du détergent.	42
Tableau 27	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différent volume du détergent.	43
Tableau 28	dégagement de CO <sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor.	44
Tableau 29	absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor mesurée après 17h de fermentation à différent volume d'inhibiteur ajoutés.	46
Tableau 30	matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différent volume d'inhibiteur ajouté.	47
Tableau 31	dégagement de CO <sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différent volume d'inhibiteur.	48

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma d'une cellule de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	2
Figure 2	Métabolisme énergétique de la Levure	4
Figure 3	La chaîne de production de la levure à LESAFFRE-MAROC	5
Figure 4	Circuit de la mélasse de LESAFFRE-MAROC	13
Figure 5	résultat du test sur la mélasse surac (canne à sucre)	41
Figure 6	résultat du test sur la mélasse sucrafor et suta (betterave)	41

## LISTE DES GRAPHES

Graphe 1	variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume du cycloheximide ajouté à la solution de la mélasse sucrador	26
Graphe 2	variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume du cycloheximide ajouté à la mélasse surac.	29
Graphe 3	variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume du cycloheximide ajouté à la mélasse suta.	32
Graphe 4	variation du volume de CO <sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse sucrador.	35
Graphe 5	variation du volume de CO <sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse surac.	38
Graphe 6	variation du volume de CO <sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse suta.	40
Graphe 7	variation du volume de CO <sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec un volume de 1ml des différents détergents ajoutés à la mélasse sucrador	44
Graphe 8	variation du dégagement de CO <sub>2</sub> en fonction du temps avec les différents détergents à un volume de 5ml.	45
Graphe 9	variation du dégagement de CO <sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de CuSO <sub>4</sub>	49
Graphe 10	variation du dégagement de CO <sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Pb.Pb(OH) <sub>2</sub> .	49
Graphe 11	variation du dégagement de CO <sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	49

# SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : la levure saccharomyces cervisiae et sa chaine de fabrication</b>	
<b>I. Généralité sur la levure.....</b>	<b>2</b>
1. Définition et composition de la levure alimentaire.....	3
2. Mode de vie de la levure.....	3
<b>II. Chaine de fabrication.....</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre 2 : la mélasse, circuit général et test physico chimique</b>	
1. Définition des mélasses.....	6
2. Composition des mélasses.....	7
3. Composant de la mélasse nuisible à la levure.....	8
4. Tests physico chimiques de la mélasse.....	9
a. Détermination du taux de saccharose.....	9
b. Détermination du taux Clerget.....	10
c. Test des sucres réducteurs.....	11
5. Circuit général de la mélasse.....	13
<b>Chapitre 3 : matériel, méthode, résultat et discussions</b>	
I. Protocole expérimental pour la détermination de la toxicité de la mélasse.....	15
1) Méthode classique.....	15
2) Méthode fermento.....	15
II. Protocole expérimental pour la détermination des sels d'ammonium quaternaires antiseptique....	17
III. Résultats et discussions.....	19
1. Détermination des limites de toxicité de la mélasse .....	20
2. Test des sels d'ammonium quaternaire.....	42
3. Influence de quelques inhibiteurs sur l'activité enzymatique.....	46
<b>Conclusion technique et perspective.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>51</b>



## INTRODUCTION

La devise « *Le client est roi* » se vérifie encore plus de nos jours. A mesure que s'améliore la qualité de la vie, la demande des produits et des services de meilleure qualité augmente également. Partout dans le monde, les clients exigent que le produit ou le service pour lequel ils ont payé correspond à leurs spécifications, répond à leurs attentes ; et qu'il fonctionne comme prévu.

Il n'est possible aujourd'hui d'atteindre le niveau de qualité requis dans un produit qu'en maîtrisant les spécifications du cahier de charge et aussi avec les normes existantes, c'est aussi s'assurer de la qualité des matières premières et aussi réduire les pertes de celle-ci.

Pour ce faire une amélioration, et évaluation qualitatives de ces composants sont recommandées afin d'assurer aux consommateurs un produit qualitatif qui répond à leurs exigences.

Toutefois cette importance se manifeste par la maîtrise des paramètres physico chimiques survenant pendant l'extrapolation des opérations de fermentation du laboratoire à l'échelle industrielle, le contrôle de la toxicité de mélasse constitue l'un de ces paramètres importants et significatifs vis-à-vis du succès de ce procédé .

Fort de cette importance et dans ce contexte discordant, le sujet : « mise en place d'une nouvelle méthode de contrôle de toxicité de mélasse » m'a été proposé. Ceci dans le but de

- Minimiser le temps par la substitution d'une méthode classique par une nouvelle méthode dite fermento.
- Recherche de la toxicité de mélasse qui est due au désinfectant utilisé au nettoyage qui est à base des ammoniums quaternaires bloquant la croissance cellulaire.
- Assurer une conformité de qualité du produit.

L'élaboration de ce rapport, a pour principale source les différents enseignements tirés de la pratique journalière des tâches auxquelles j'étais affecté. Enfin, les nombreux entretiens que j'ai pu avoir avec les employés du laboratoire de la société, m'ont permis de donner une cohérence à ce rapport.

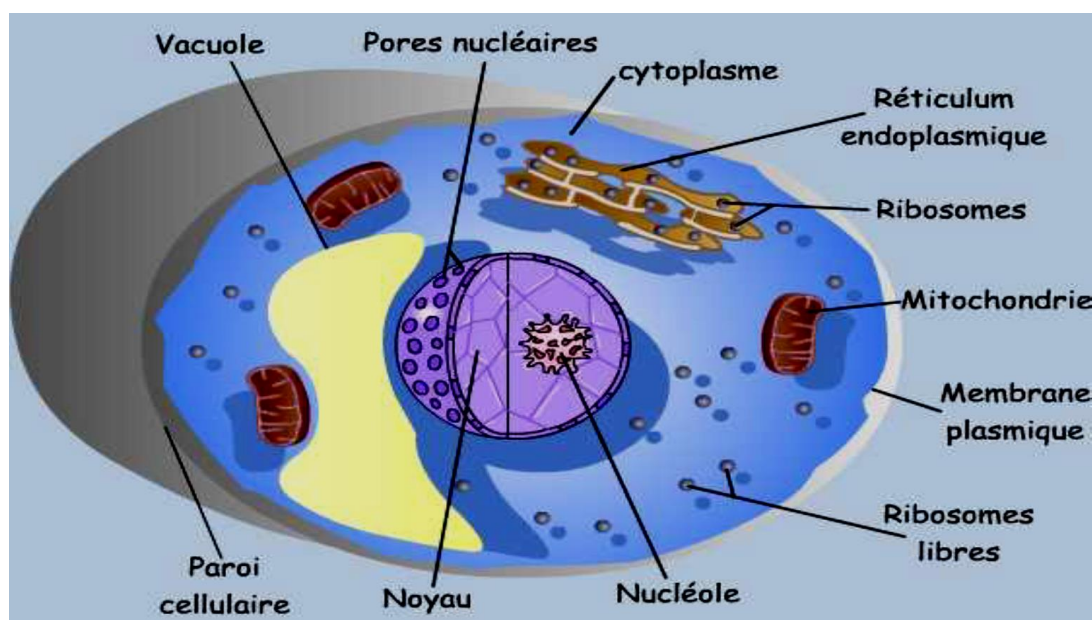
Dans ce présent rapport, nous procéderons dans une première partie à la présentation générale de la levure boulangère, puis nous exposerons tout le processus de fabrication, ensuite, nous présenterons toutes les analyses effectuées et on terminera enfin par une conclusion générale.

**CHAPITRE 1 :**  
**LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE**  
**ET SA CHAÎNE DE PRODUCTION**

## I. Généralités sur la levure :

Généralement définies comme des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou par fission, les levures sont réparties en 3 classes : les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes (Kreger-Van Rij, 1969). Parmi ces levures, l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* appartenant à la classe des ascomycètes et au genre *Saccharomyces* est la plus impliquée dans les productions industrielles.

La croissance optimale de cette levure se situe à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 5,0 et les différentes souches sont ubiquistes, c'est-à-dire capables de se développer en milieu aérobie et en milieu anaérobie (Rose, 1987). Cette propriété lui permet d'accroître sa biomasse en présence ou en absence d'oxygène mais à des rythmes différents ; la production en aérobose autorise un accroissement de sa biomasse presque 20 fois supérieur à celui de la fermentation



**Figure n°1 : Schéma d'une cellule de saccharomyces cerevisiae**

Une cellule *saccharomyces cerevisiae* est constituée de:

**Une membrane cytoplasmique** : protégée par la paroi cellulaire, assurant les échanges avec l'extérieur.

**Un cytoplasme** : une sorte de gelée, constituant le substrat même de la vie de la cellule.

**Un noyau** : qui contient les chromosomes (éléments qui portent les caractéristiques génétiques), réglant la transmission des caractères héréditaires et l'essentiel des réactions qui se produisent à l'intérieur de la cellule.

**Des vacuoles :** emmagasinant les substances de réserve diverses.

**Des mitochondries :** qui sont les véritables centrales énergétiques de la cellule lorsque celle-ci fonctionne en présence d'oxygène. Leur rôle est d'utiliser les sucres mis à la disposition de la levure pour produire de l'énergie et permettre ainsi à la cellule d'assurer sa croissance.

**Des ribosomes :** qui sont de petites structures (ou organites) présentes dans le cytoplasme des cellules. Ce sont elles qui assemblent les acides aminés pour former les protéines. Ils suivent pour cela le plan de montage contenu dans l'ADN (ARN messenger)

## 1. Définitions et compositions de la levure alimentaire :

La définition de la levure aliment destinée à l'alimentation de l'homme établie par la CEE ne fait pas état de la teneur en acides aminés et vitamines [2]. Elle est la suivante:

**Tableau 1 :** Compositions des levures-aliment

Humidité absolue	4 à 5g pour 100g
Protéines (N x 6,25)	45 à 52g pour 100g
Lipides (55-75 % d'Acides insaturés)	5 à 9g pour 100g
Glucides (glycogène surtout)	27 à 36g pour 100g
Cendres	7 à 9g pour 100g
Germes totaux	50000 par g
E. Coli	Absence dans 0,1g
Salmonelles	Absence dans 25g
Staphylocoques	Absence dans 0,1g
moisissures	< 100 /g

## 2. Mode de vie de la levure :

Pour son développement, la levure de boulanger a besoin de composés carbonés source de carbone et d'énergie, de composés azotés réduits sous forme d'ammonium. d'éléments minéraux variés, vitamines et facteurs de croissance. La levure a la particularité de pouvoir vivre en présence ou en absence d'air : ces deux processus énergétiques sont la respiration et la fermentation. Elle se nourrit de glucose et de fructose (sucres simples).

En présence d'air, la levure respire : elle dégrade les sucres simples (en C6) présents dans son milieu de vie, par un métabolisme oxydatif qui conduit à la formation d'eau, de gaz carbonique et une grande quantité d'énergie (vie, croissance et multiplication).

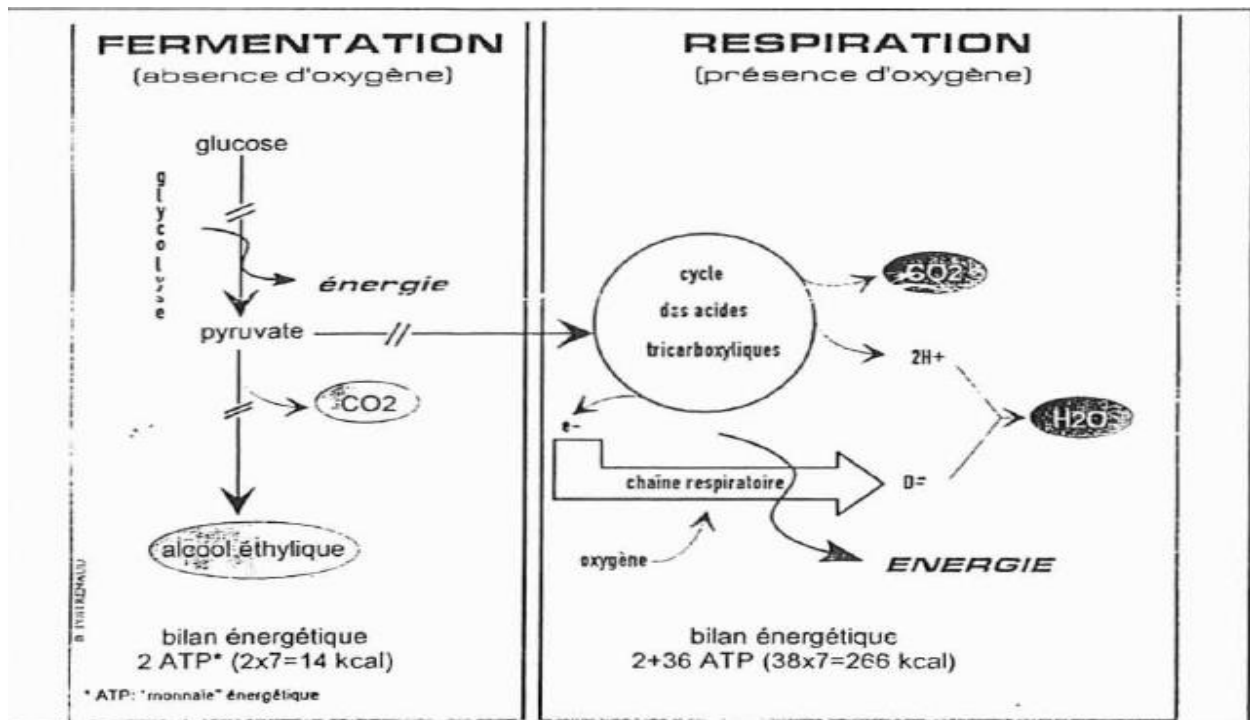


Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules une importante multiplication.

En l'absence d'air, la levure fermente : grâce à ses enzymes (les zymases), elle dégrade les sucres simples (en  $C_6$ ) présents dans son milieu de vie, par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation du gaz carbonique, d'alcool et un peu moins d'énergie, Ce métabolisme fermentatif moins énergétique que le métabolisme oxydatif, affecte la multiplication cellulaire mais a l'avantage de permettre à la levure de survivre même en anaérobiose.



Comme en anaérobiose, le glucose suit la voie de la glycolyse jusqu'au pyruvate ; mais, en présence d'oxygène, celui-ci ne sera pas transformé en éthanol mais en acétyl-CoA qui permettra l'entrée dans **le cycle de Krebs**. En raison de son meilleur rendement énergétique, la voie respiratoire est utilisée préférentiellement par la levure. Cependant, si la concentration en sucre du milieu augmente ( $> 100 \text{ mg/L}$ ), il y a inhibition de la respiration par la fermentation et production d'alcool malgré la disponibilité d'oxygène. **C'est l'effet Crabtree**, appelé aussi effet glucose.



**Figure n°2 : Métabolisme énergétique de la Levure**

## II. Chaîne de fabrication :

L'objectif des fabricants de levures est de produire un nombre important de levures capable de garder leur aptitude à fermenter pendant 4 semaines au minimum dans des conditions de stockage de 4°C. Les matières premières apportées sont les besoins nutritifs.

Les levures se multiplient par bourgeonnement, en fermentation aérobie avec un temps de dédoublement de 1H30min dans des conditions de suralimentation avec production d'alcool. Les étapes sont : Phase de laboratoire – phase de pré fermentation – phase de séparation par centrifugation – phase de filtration sous vide – phase de conditionnement

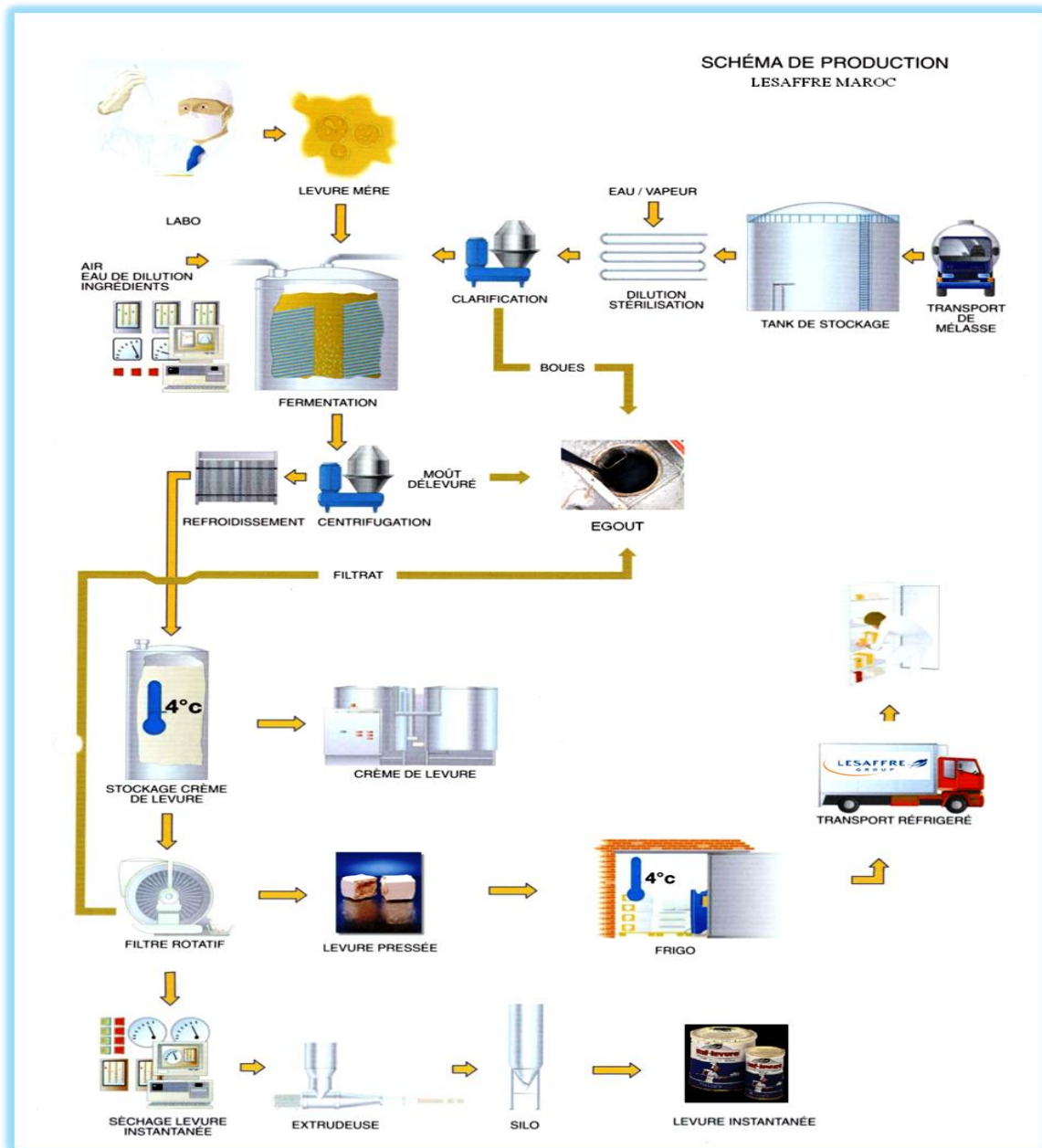


Figure n°3: La chaîne de production de la levure à LESAFFRE-MAROC

## **CHAPITRE 2 :**

### **LA MÉLASSE, CIRCUIT GÉNÉRAL ET TEST PHYSICO- CHIMIQUE DE MÉLASSE.**

## I. Mélasse :

### *1. Définition :*

La mélasse est le coproduit de la fabrication du sucre de canne et du sucre de betterave, c'est un liquide sucré et visqueux dont la teneur en sucres peut aller de 43 à 50%. La mélasse présente des qualités nutritionnelles exceptionnelles en tant que source d'énergie naturelle. Les caractéristiques physiques et chimiques de la mélasse la rendent utile dans un grand nombre de processus industriels. C'est un substrat de fermentation incontournable pour la levure de panification.

Il existe 3 types de mélasse :

### *Mélasse de betterave :*

Elle provient de la fabrication du sucre extrait de la betterave. Elle se présente sous la forme d'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 contient aussi 10 à 12 % de protéine.

### *Mélasse de canne :*

Elle provient de la fabrication du sucre extrait de la canne à sucre. Elle se présente sous la forme d'un liquide visqueux et homogène de couleur marron foncé à noir, d'odeur et de saveur caractéristiques de la réglisse. Elle est produite dans les pays tropicaux, à climat chaud et humide. La teneur en sucres (environ 45%) est constituée de saccharose (2/3) et de sucres réducteurs comme le glucose et le fructose (1/3).

### *Mélasse de raffinerie :*

Elle 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 des produits alimentaires (confiserie, biscuiterie, etc...).



Canne à sucre



Betterave sucrière



## 2. composition des mélasses :

La composition des diverses formes de mélasse offre des différences importantes selon le pays d'origine, le processus de fabrication, la saison et les conditions de stockage. 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 sulfuriques et des sels minéraux, des éléments sous forme de traces et des stimulateurs de croissance. [5]

**Tableau 2** : composition moyenne des mélasses de betterave et de canne à sucre

	Mélasse de betterave (%)	Mélasse de canne (%)
Eau	16.5	20.00
Sucre	53.0	62.0
Saccharose	51.0	32.0
Glucose	00	14.0
Fructose	00	16.0
raffinose	1.0	00
Elément azotés	Env- 15.0	Env-6.0
Cendres	11.5	8.0
K <sub>2</sub> O	Variable	Variable
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Assez peu	Un peu plus
Mg	Assez peu	Assez peu
biotine	0.02-0.1 ppm	1-3 ppm
PH	Faiblement alcalin (>7)	Faiblement acide (4.5-6)

Dans la mélasse de betterave, la plus grande partie de sucre assimilable est le saccharose, tandis que dans la mélasse de canne on trouve aussi des proportions appréciables de glucose et de fructose, en outre, le taux de biotine est assez élevé dans la mélasse de canne à sucre. De même que le taux des matières solides, il est plus élevé que dans la mélasse de betterave, ce qui peut compliquer la méthode de nettoyage.

D'autre part, il n'est pas rare que la mélasse contienne à différentes concentrations, des matières nuisibles aux cellules (Nitrite, Acide formique,....etc.). Ces derniers sont considérés comme des constituants indésirables (toxiques et inhibiteurs) pour la croissance, l'aspect de la levure et donc du rendement final de la fermentation.

### 3. Composants de la mélasse nuisibles à la levure :

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<sup>+</sup> 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 SO<sub>2</sub> a un effet défavorable sur l'activité fermentative des levures. [3]
- 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 faites de composés d'adsorption comme la pectine et le sucre, les substances gommeuses et la mucine.
- Métaux lourds (plomb, cuivre, mercure, argent)

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.

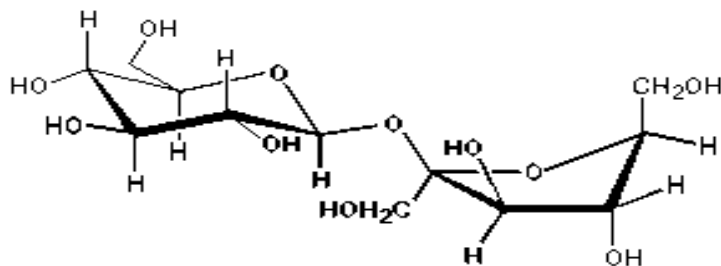
#### 4. Tests physico chimiques de la mélasse

##### a) Détermination du taux du saccharose :

###### *Définition :*

Le saccharose, ou sucrose, est le sucre commercial extrait de la betterave sucrière ou de la canne à sucre.

C'est un sucre double constitué par la condensation de deux oses : une molécule de glucose et une molécule de fructose. Son nom officiel est le  $\alpha$ -D-glucopyranosyl (1->2)  $\beta$ -D-fructofurannoside. Il peut être symbolisé par Glc-Fru. C'est un glucide simple.



###### *Mode opératoire :*

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

###### *Calcul du taux du saccharose :*

A l'aide d'un Polarimètre on mesure la polarisation c'est-à-dire l'angle de rotation  $\alpha_1$ . Le taux du saccharose est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Taux du saccharose (\%)} = \alpha_1 \cdot 10 \cdot 0.77 / \text{PE}$$

Avec :

$\alpha_1$  : l'angle de rotation

10 : facteur de dilution

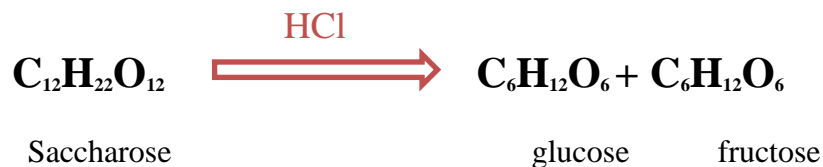
0.77: constante de l'appareil

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 50ml du filtrat, on y ajoute 5ml 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.  $\alpha_2$ , le Clerget est calculé par l'équation suivante:

$$\% \text{Clerget} = ([\alpha_1 + (1,1 * \alpha_2)] * 1,1 * 0,77 / [144 - (T^\circ / 2)] * PE) * 100$$

Avec :

$\alpha_1$  : angle de rotation du saccharose

$\alpha_2$  : angle de rotation du saccharose inversé

1,1 : facteur de dilution

0,77 : constante de l'appareil

PE : prise d'essai

T° : température du filtrat en (°C).

### c) Test des sucres réducteurs :

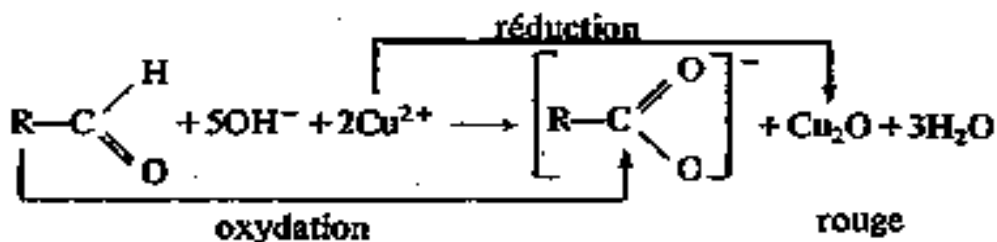
#### Définition :

Sucres contenant un groupe aldéhyde ou cétonic libre qui leur permet de s'oxyder rapidement. Les sucres réducteurs sont des sucres simples réactifs, on peut citer le glucose, le fructose et le maltose.

#### Réaction de Fehling :

La solution de **Fehling** (ou liqueur de Fehling) contient des ions cuivre (II) complexés par les ions **tartrate** en milieu **basique**. **Les ions tartrate permettent de maintenir en solution les ions cuivre (II) à un pH auquel ils seraient précipités sous forme d'hydroxyde Cu(OH)<sub>2</sub> s'ils n'étaient complexés.** Les ions cuivre (II) constituent l'**oxydant** de l'aldéhyde et le milieu basique est nécessaire pour que la réaction ait lieu.

À chaud, en présence d'une substance réductrice, la liqueur de Fehling donne un précipité rouge d'oxyde de cuivre Cu<sub>2</sub>O (cuivre I) selon l'équation ci-dessous :



La réaction n'est pas spécifique d'une substance quelconque puisqu'elle détecte simplement des propriétés réductrices. Elle est utilisée, cependant, pour mettre en évidence la présence de sucres réducteurs dans une solution. En effet, La recherche des sucres réducteurs avec la liqueur de Fehling doit être réalisée sur une solution **déprotéinée** car la réaction est positive, même à froid, avec des protéines. on peut éliminer les protéines d'une solution en la traitant par hydroxy **d'acétate de plomb** et en éliminant le précipité formé par filtration.

#### Mode opératoire :

On pèse 20g de mélasse dans une fiole de 200ml, on y ajoute quelques ml d'acétate de plomb et on complète à 200ml avec l'eau distillée. On filtre notre mélange à l'aide d'un papier filtre et on récupère le filtrat. On prélève 2 ml de filtrat, on y ajoute 10ml de double tartrate de sodium et 10ml de Sulfate du cuivre en agitant puis on complète à 30ml avec l'eau distillée. On porte le mélange à ébullition pendant 8 minutes.

Après refroidissement, on ajoute 5ml d'acide acétique (5N) et 20ml d'une solution d'iode (N/30) 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 du vert en bleu.

-on effectue aussi un dosage du blanc.

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

### *Calcul du taux des sucres réducteurs :*

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

$$\text{Taux des sucres réducteurs (\%)} = (V_{\text{(blanc)}} - V_{\text{(échantillon)}}) * 1.03 / \text{PE (g)}$$

Avec:

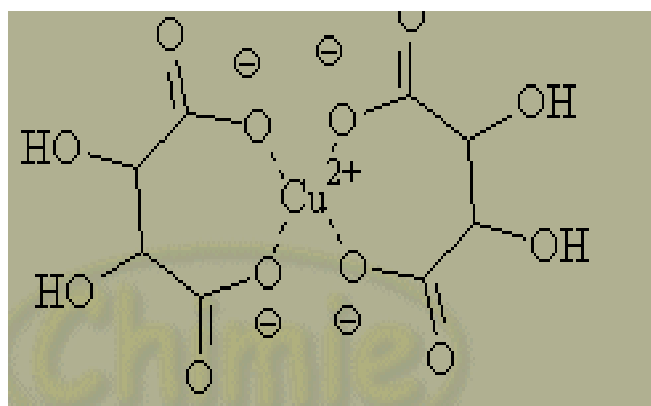
**V (blanc)** : volume des thiosulfates de sodium versé lors du dosage du blanc.

**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  $\text{PbCl}_2$  (dans le cas de Clerget).

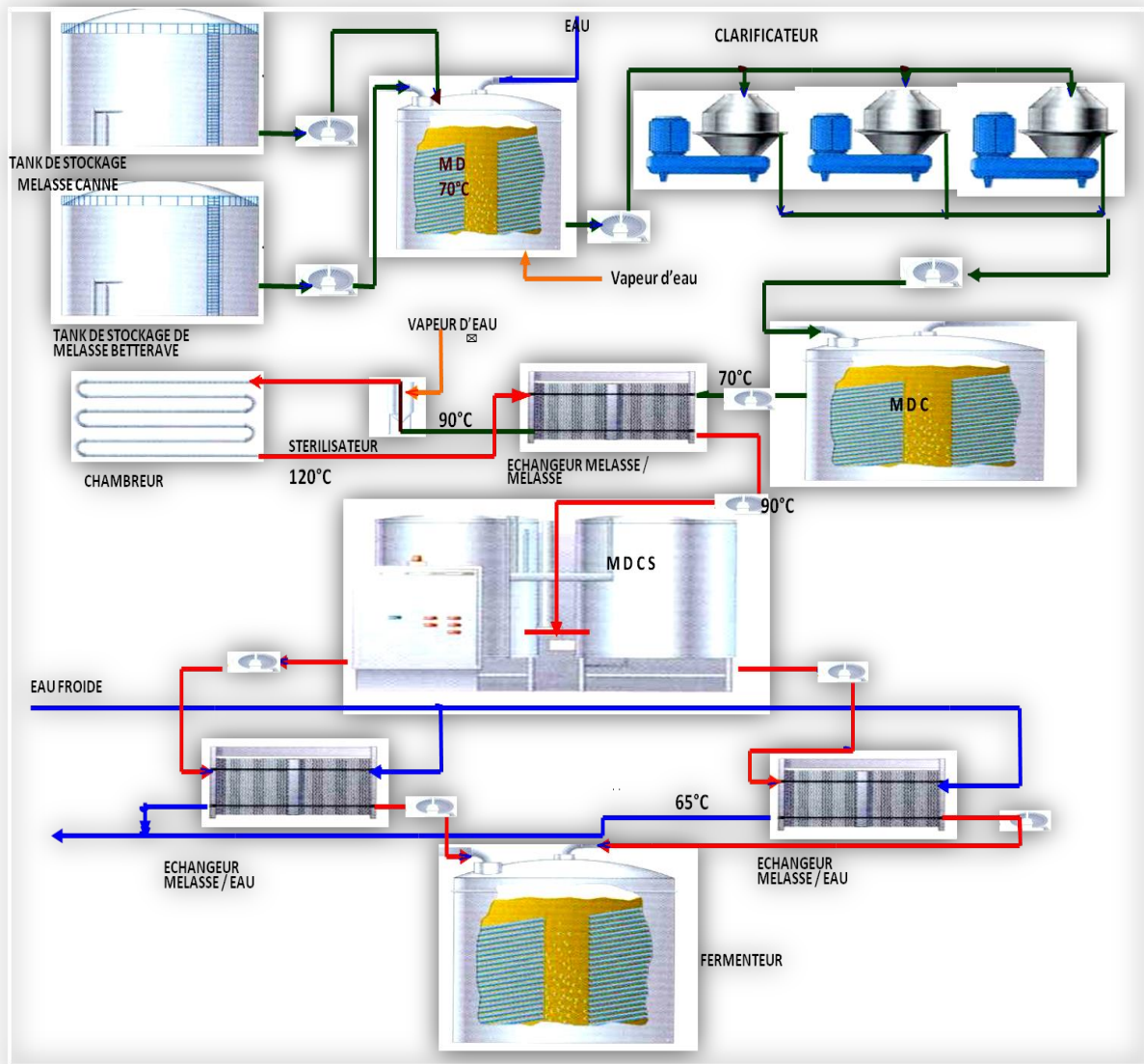


**Complexe cuivre (II)-tartrate**

Ce complexe est qualifié de complexe plan-carré. Il est chargé donc soluble dans le milieu. En l'absence de ce complexe il se formerait un précipité d'hydroxyde de cuivre (II).

## Circuit de la mélasse et clarification :

Il est présenté par la figure suivante :



**Figure n °4** : Circuit de la mélasse de LESAFFRE-MAROC

A LESAFFRE-MAROC les deux types de mélasse, celles de canne et de betterave sont réceptionnées dans des tanks (puis mélangées dans les proportions de 20% de canne pour 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.

### La 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) ou continue d'une manière périodique (bols à assiettes auto débourbeurs) ou 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 8m<sup>3</sup>/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 ultérieur 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 thermiques à plaques mélasse / eau froide, la mélasse se refroidie ainsi que l'eau se réchauffe qui sera utilisée dans la dilution par la suite.



## **CHAPITRE 3 :**

### **MATÉRIEL, MÉTHODE, RÉSULTATS ET DISCUSSIONS**

## Matériel 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 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 essai (contient le cycloheximide),

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

-Stériliser les fioles avec 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 de la solution après 17h de fermentation et 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 CO<sub>2</sub> 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,(30°C)
- Peser dans un bécher 3g de mélasse + 0.11g d'extrait de levure +50ml 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,
- 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 CO<sub>2</sub> dégagé chaque 10 min.

### Matériel

- 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 antiseptique

### Principe :

Les sels d'ammonium quaternaire 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 sec

#### 3) Manipulation :

Les matériels lavés à l'eau chaude puis l'alcool 95% et séchés à l'étuve. En effet s'il y a des traces de détergents anioniques (savon, dérivés sulfoniques) elles inhibent la réaction colorée.

- Peser 10g 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 diluée à 100%,
  - ✓ 0,5 ml de la solution d'hélianthine à 0,15%,
  - ✓ 1 ml de la lessive de soude diluée 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 (+ou - 5g) de sulfate de sodium dans le verre à pied et laisser couler environ 15 ml de l'émulsion chloroformique (la solution inférieure de l'ampoule) dans le verre à pied,
- 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 cinq fractions de 5 ml de chloroforme pur,
- Mettre chaque fraction dans l'erlenmeyer,

**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,
- Déposer 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,
- Patoir pour les tubes à essai.

### Réactifs

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

### Instrumentation

Spectrophotomètre UV : **MILTON ROY SPECTRONIC 601**

THERMOSTAT : **FISHER BIOBNOC SCEINTIFIQUE POLYSTAT**

### **III-résultat et discussions :**

#### **Objectif de l'étude :**

Il est connu que les levures, champignons et certaines bactéries peuvent se multiplier (cas de la production de la biomasse) sur des sous-produits issus des sucreries (mélasse), ceux-ci constituent pour le micro-organisme un substrat qui est largement utilisé en industrie.

Une mélasse toxique ajoutée à la levure, bloque la multiplication de celle-ci et qui aura un effet négatif sur la production d'où la nécessité d'évaluer le degré de toxicité de différents types de mélasse.

Pour pallier à ce problème, nous avons essayé une nouvelle méthode de contrôle de toxicité déterminée par la stabilité du dégagement de CO<sub>2</sub> en se basant sur la méthode classique permettant la stabilité de la biomasse.

Pour ce faire, en ajoutant le cycloheximide à la mélasse, afin de détecter l'effet de celui-ci et son degré par la méthode chimique, ensuite nous avons essayé de détecter le même effet par la nouvelle méthode dite « fermento ». Le but étant d'arriver à une possible substitution de la méthode chimique par la nouvelle méthode étant donné que la méthode chimique dure environ 14h de plus que la nouvelle méthode, soit 17h de temps au minimum pour la 1ère et 3h de temps pour la 2ème méthode

Parallèlement à ce qui précède, nous allons révéler la présence des ions ammoniums quaternaires connus comme étant un obstacle à multiplication cellulaire. Une question qui reste posée sur l'origine de ces ammoniums quaternaires.

## 1. Détermination des limites de toxicité de la mélasse :

### a. 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 total .notez que cette méthode dure environ 17h.

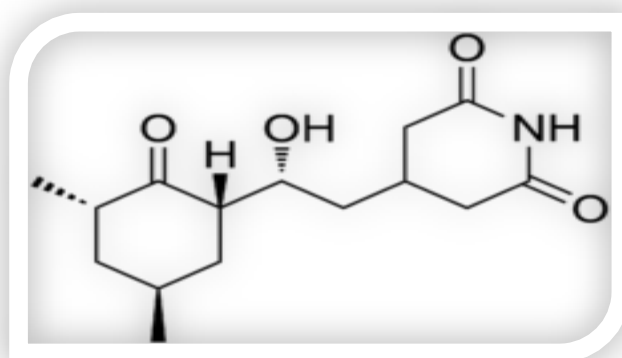
Les tests de toxicité classique a pour but de :

- ✚ 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 Lesaffre 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 en cas des situations inaperçues.

**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. C'est un inhibiteur à la fois de la phase d'initiation et d'élongation dans la synthèse protéique. 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 n°5 : structure chimique de cycloheximide**

On décide de faire des tests sur les différentes mélasses soit la canne à sucre (surac) soit la betterave (sucrafor, suta) pour contrôler le degré de toxicité de celles-ci et prouver une nouvelle méthode de mesure de toxicité en se basant sur l'ancienne méthode.

Avant de passer aux tests effectués sur les différentes mélasses on va définir :

- Les paramètres et les facteurs pour mesurer cette toxicité.
- La méthode de calcul de degré de toxicité.
- Et ces limites de toxicité pour affirmer sa qualité.

<b>Facteur de dilution (FD)</b>	<b>FD=2000</b>
<b>Facteur de conversion (FC)</b>	<b>FC=0.44</b>
<b>Q (matières sèches par 20 ml) =A*FD*FC</b>	<b>R (toxicités) = <math>\sqrt[17]{Q/2,5}</math></b>
<b>Masse de levure en mg incubée dans chaque fiole de fourneau contenant 20 ml de mélasse</b>	<b>2.5mg</b>

### Limite de toxicité :

	<b>Limite de toxicité</b>		
<b>Q ≤ 90 mg/20ml</b>	<b>mélasse toxique</b>	<b>R ≤ 1,242</b>	<b>mélasse toxique</b>
<b>90 &lt; Q &lt; 140 mg/20ml</b>	<b>mélasse moyennement toxique</b>	<b>1,242 &lt; R ≤ 1,272</b>	<b>mélasse moyennement toxique</b>
<b>Q &gt; 140 mg/20ml</b>	<b>mélasse non toxique</b>	<b>R &gt; 1,272</b>	<b>mélasse non toxique</b>

On procède tel que décrit dans la méthode classique, en mesurant l'absorbance (grandeur liée à la quantité de la lumière absorbée par la solution) du mélange obtenu après 17h de fermentation grâce à un spectrophotomètre à une longueur d'onde 600nm (valeur de la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance de la solution de la levure est maximale, puis nous avons évalué l'évolution de biomasse par calcul de quantité de la levure en mg de matières sèches dans 20 ml de la solution.



## Mélassesucrafor

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

**Tableau n° 3** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélassesucrafor mesurée après 17h de fermentation en absence du cycloheximide.

ABSORBANCE(A)	SANS Cycloheximide		
	<b>0.300</b>	<b>0.269</b>	<b>0.312</b>
	<b>0.295</b>	<b>0.300</b>	<b>0.250</b>
	<b>0.284</b>	<b>0.328</b>	<b>0.315</b>

**Tableau n°4** : matière sèche récoltée après 17h de fermentation par un volume de 20ml de la solution de la mélassesucrafor en absence du cycloheximide.

quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélassesucrafor	SANS Cycloheximide		
	<b>264</b>	<b>236.72</b>	<b>274.56</b>
	<b>259.6</b>	<b>264</b>	<b>220</b>
	<b>249.92</b>	<b>288.64</b>	<b>277.2</b>

D'après le tableau 4, les valeurs de la quantité en matière sèche calculée se trouvent au-dessus de la limite supérieure de toxicité (140mg de matière sèche /20ml) cela montre que la mélasses n'est pas toxique, elle peut être utilisée en tant qu'élément nutritif pour la multiplication cellulaire de la levure.

Etant donné que la mélasses n'est pas toxique et dans le but de fixer les limite de toxicité définies par la stabilité de dégagement de CO<sub>2</sub> par la nouvelle méthode dite fermento en ajoutant le cycloheximide à différentes concentrations pour déterminer l'intervalle de toxicité par cette nouvelle méthode de plus détecter leur effet et son degré sur la croissance de la levure.

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

**Tableau n°5:** absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor mesurée après 17h de fermentation à différent concentration de cycloheximide.

Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse	Avec cycloheximide							
	1%	0.1%	0.05%	0.01%			0.001%	
	1ml	1ml	1ml	1ml	0.75ml	0.5ml	0.25ml	1ml
ABSORBANCE (A)	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	0.215
	0.006	0.008	0.012	0.014	0.017	0.022	0.119	0.216

**Tableau n°6 :** matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différenes concentrations du cycloheximide.

Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse	Avec cycloheximide							
	1%	0.1%	0.05%	0.01%			0.001%	
	1ml	1ml	1ml	1ml	0.75ml	0.5ml	0.25ml	1ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor	5.28	7.92	8.8	11.44	15.84	21.12	104.72	186.56
	4.4	8.8	8.8	12.32	15.84	22	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 6, 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 fort toxicité de mélasse. Cependant, la concentration de 0,001 g/l de cycloheximide ne présent aucun effet observable sur le fonctionnement de la cellule.

Dans le but de déterminer une valeur proche à la limite de toxicité, on suppose de travailler à des volumes inférieurs à 0.25ml pour la concentration 0.01% ou à des volumes supérieurs à 1ml pour la concentration 0.001% mais on a fixé l'étude sur la concentration 0.001% pour qu'on puisse montrer un intervalle de toxicité bien définie ou il y a une mélasse

**N'est pas toxique- moyennement toxique- toxique**

Nous avons opté par la suite les volumes : 1,25ml, 1,5ml, 1,75, 2 ml de cycloheximide à une concentration de 0.001% pour la mélasse sucrador :

Les tableaux suivants regroupent les résultats trouvés :

**Tableau n°7** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrador mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1.25ml	1.5ml	1.75ml	2ml
ABSORBANCE (A)		0.200	0.177	0.144	0.105
		0.201	0.178	0.145	0.102
		0.203	0.176	0.143	0.103

**Tableau n°8** : matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrador à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1.25ml	1.5ml	1.75ml	2ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrador		176	155.76	126.72	88.0
		176.88	156.64	127.6	88.88
		178.64	154.68	125.84	89.76

D'après les résultats obtenus dans le tableau, on remarque que la non toxicité est présente avec les volumes 1.25, 1.5, le volume 1.75 considéré comme légèrement toxique car sa concentration inclut dans l'intervalle de toxicités par contre le volume 2ml se situe à la limite inférieure de toxicité donc on peut le considérer toxique.

Etant donné que la limite de toxicité supérieure comprise entre le volume 1.5 et 1.75 donc on va fixer l'étude sur les volumes : 1,55 ; 1,6 ; 1,65 ; 1,7.

Les résultats sont mentionnés dans les tableaux suivants :

**Tableau n°9** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1.55ml	1.6ml	1.65ml	1.7ml
ABSORBANCE (A)		0.174	0.170	0.165	0.159
		0.174	0.169	0.166	0.160
		0.175	0.170	0.164	0.159

**Tableau n°10** : matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1.55ml	1.6ml	1.65ml	1.7ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor		153.12	149.6	145.2	139.92
		153.12	148.72	146.06	140.8
		154	149.6	144.32	139.92

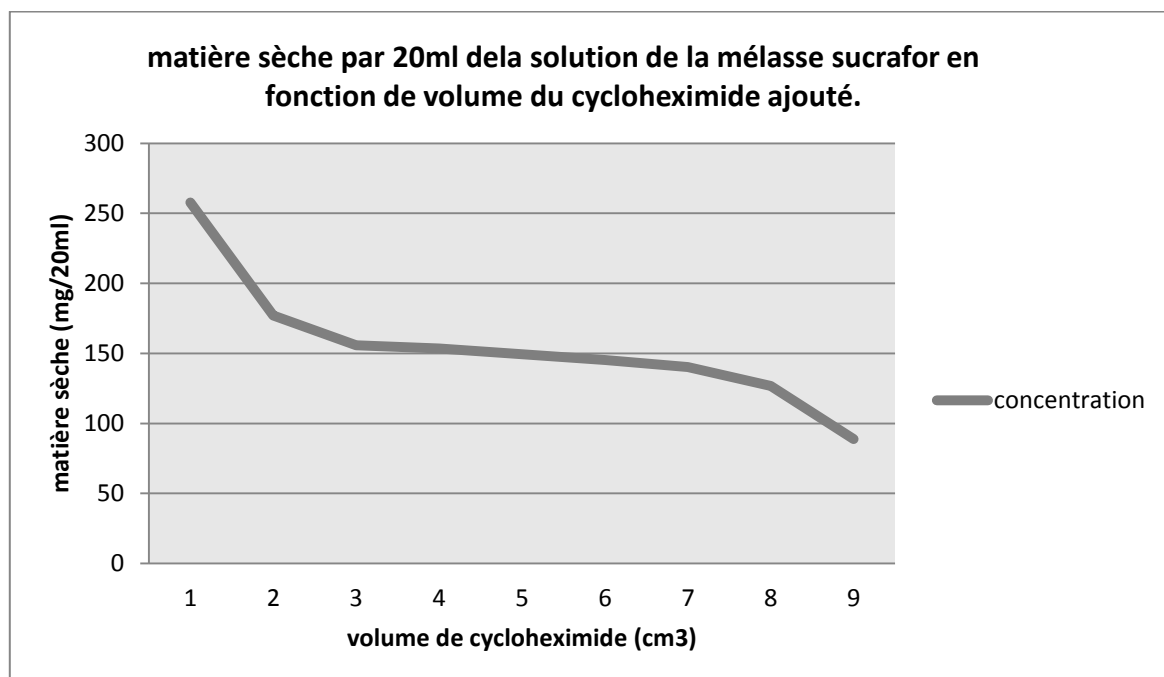
D'après les résultats obtenus, on remarque que la limite de toxicité supérieure correspond à un volume de 1,7 ml. et les autres volumes présentent une légère toxicité.

A partir de la matière sèche calculée par chaque fiole, nous avons calculé leur moyenne afin de les tracer en fonction du volume de cycloheximide ajouté :

**Tableau n°11** : impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse sucrador sur la croissance cellulaire.

<b>Volume de cycloheximide1 dans 100g de mélasse</b>	<b>0</b>	<b>1.25</b>	<b>1.5</b>	<b>1.55</b>	<b>1.6</b>	<b>1.65</b>	<b>1.7</b>	<b>1.75</b>	<b>2.00</b>
<i>Moyenne de matière sèche pour chaque volume de cycloheximide</i>	<i>257.84</i>	<i>177.17</i>	<i>155.76</i>	<i>153.41</i>	<i>149.31</i>	<i>145.19</i>	<i>140.21</i>	<i>126.72</i>	<i>88.88</i>

Le graphe ci –dessous montre la variation de matière sèche en fonction de volume de cycloheximide ajouté :



**Graphe n° 1** : variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume du cycloheximide ajouté à la solution de la mélasse sucrador

Ce graphe illustre l'effet de cycloheximide sur la multiplication de la levure, cela est expliqué par la diminution de la matière sèche en augmentant le volume de cycloheximide ce qui implique l'inhibition de l'activité enzymatique.

## Mélasse surac

La mélasse SURAC à subit le même test que celui effectué sur la mélasse sucrafor.

De même, nous avons travaillé avec la concentration de 0,001 % 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 n°12:** absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse surac mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0,001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,25ml	1,5ml	1,75ml	2ml
ABSORBANCE (A)		0,237	0,179	0,105	0,058
		0,233	0,174	0,104	0,060
		0,235	0,179	0,104	0,052

Le tableau regroupe les résultats des matières sèches calculées après 17h de fermentation :

**Tableau n°13:** matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse surac à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001% .

		0,001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,25ml	1,5ml	1,75ml	2ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse surac		208,56	157,52	92,4	51,04
		205,04	153,12	91,52	52,8
		206,8	157,52	91,52	45,76

D'après les résultats obtenus pour la mélasse surac on remarque que la limite de toxicité inférieure correspond à un volume de 1.75 cm<sup>3</sup>.

Les volumes 1.25 et 1.5 sont au-dessus de la limite de toxicité donc ne présentent pas une toxicité par contre le volume 2 est en dessous de cette limite d'où la toxicité.

Retrouvons ci-après les résultats des absorbances pour les volumes : 1,55 - 1,6 - 1,65 - 1,7ml

**Tableau n°14 :** absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse surac mesurée après 17h de fermentation à différents volumes de cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0,001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,55ml	1,6ml	1,65ml	1,7ml
ABSORBANCE (A)		0,159	0,139	0,124	0,118
		0,16	0,140	0,127	0,119
		0,159	0,138	0,125	0,120

D'après les résultats précédentes on a remarqué que la limite supérieure est comprise entre les volumes 1,55 et 1,75

Les résultats des matières sèches calculées sont reportés sur le tableau suivant :

**Tableau n°15:** matière sèche récoltée après 17h de fermentation par de 20ml de la solution de la mélasse surac à différent volume du cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0,001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,55ml	1,6ml	1,65ml	1,7ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse surac		139,92	122,32	109,12	103,84
		140,8	123,2	111,76	104,72
		139,92	121,44	110	105,6

Les résultats trouvés montrent que la limite supérieure correspond à un volume de 1.55cm<sup>3</sup>, mais d'après les autres volumes (1,6 - 1,67 - 1,7) on constate une légère toxicité due au cycloheximide qui affecte les parois des cellules ce qui empêche la formation de l'**invertase**

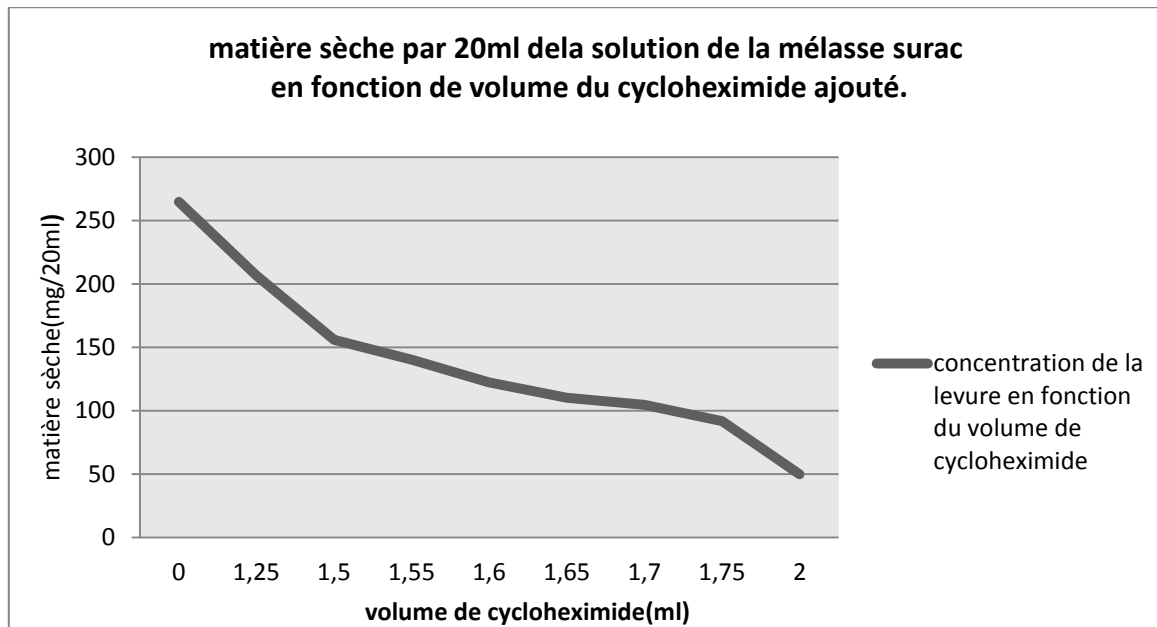
(enzyme responsable d'hydrolyse de saccharose en glucose et fructose assimilable par la levure)

A partir des valeurs de matières sèches calculés pour chaque fiole de 20 ml de mélasse surac, on va calculés leur moyennes afin de les tracer en fonction du volume de cycloheximide ajouté :

**Tableau n°16** : impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse surac sur la croissance cellulaire

<b>Volume de cycloheximide1 dans 100g de mélasse</b>	0	1,25	1,5	1,55	1,6	1,65	1,7	1,75	2,00
<b>Moyenne de matière sèche pour chaque volume de cycloheximide</b>	264,88	206,8	156,05	140,21	122,32	110,29	104,72	91.81	49,86

Le graphe ci –dessous montre la variation du matière sèche en fonction du volume de cycloheximide ajouté :



**Graphe n°2:** variation de la matière sèche moyenne en fonction de volume du cycloheximide ajouté à la mélasse surac.

De même que pour la mélasse surac, ce graphe illustre l'effet d'inhibiteur (le cycloheximide) en augmentant son volume d'où la diminution de l'activité enzymatique.



## Mélasse suta

On va travailler même pour la mélasse suta à une concentration de 0.001%, en variant les volumes de cycloheximide correspondants aux limites de toxicité de cette dernière.

Les résultats des absorbance obtenu est sur le tableau suivant :

**Tableau n°17:** absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse suta mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%.

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,25ml	1,5ml	1,75ml	2ml
ABSORBANCE (A)		0,205	0,180	0,159	0,149
		0,208	0,182	0,160	0,150
		0,205	0,180	0,159	0,151

Le tableau montre les résultats des matières sèches calculés par 20ml de mélasse suta :

**Tableau n°18:** matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse de la solution de la mélasse suta à différents volumes du cycloheximide à une concentration de 0.001%

		0.001%			
Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse		1,25ml	1,5ml	1,75ml	2ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse suta		180,4	158,4	139,92	131,12
		183,04	160,16	140,8	132
		180,4	158,4	139,92	132,88

Les résultats obtenus montrent que la limite supérieur correspond à un volume de 1,75 tandis que les volumes 1,25 et 1,5 ne présentent pas une toxicité par contre à 2ml s'apparaître une légère toxicité d'où l'effet de cycloheximide.

Etant donné que la limite supérieure correspond à un volume de 1.75ml, donc on va fixer l'étude entre 1.55 et 2.5 ml pour qu'on puisse déterminer la limite inférieure pour la mélasse suta :

Le tableau suivant montre les résultats des absorbance obtenu :

**Tableau n°19** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse suta mesurée après 17h de fermentation à différent volume de cycloheximide à une concentration de 0.001%

Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse	0.001%					
	1,55	1,6	1,65	1,7	2,25	2,5
ABSORBANCE(A)	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

Les résultats des matières sèches calculées sont regroupés sur le tableau suivant :

**Tableau n°20** : matière sèche récoltée après 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse suta à différent volume du cycloheximide à une concentration de 0.001%

Volume de cycloheximide dans 100g de mélasse	0.001%					
	1,55	1,6	1,65	1,7	2,25	2,5
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse suta	154,88	153,6	148,72	143,44	119,68	89,76
	155,76	150,48	149,6	140,8	122,32	88,88
	156,64	151,36	148,72	143,44	121,14	89,76

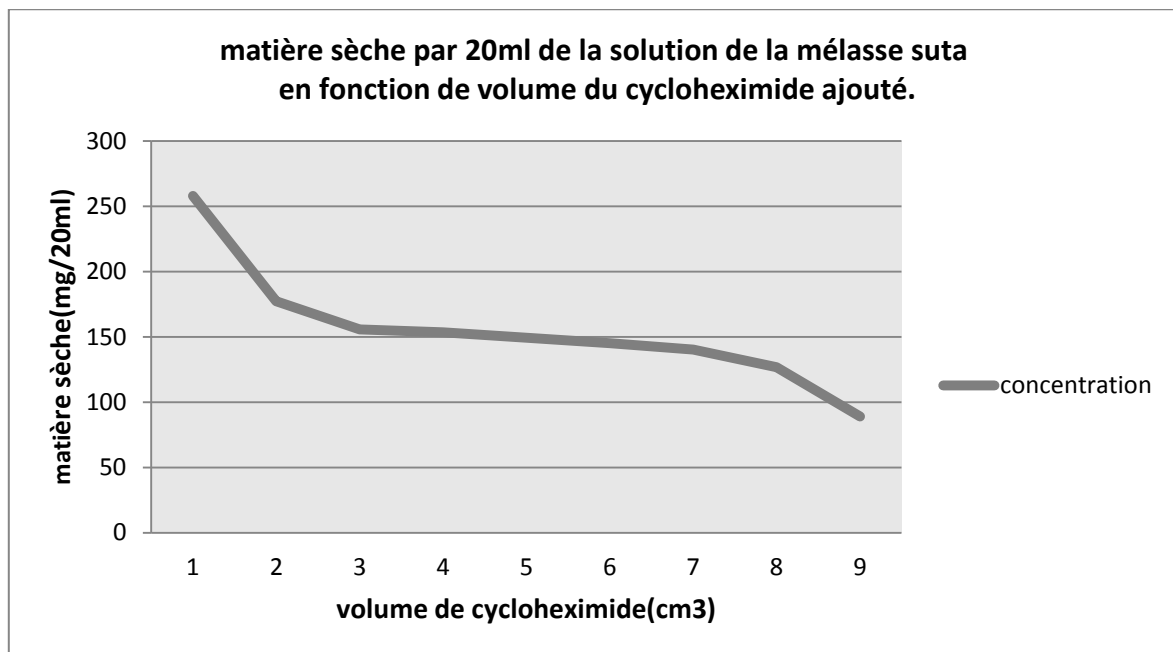
D'après les tableaux on remarque que la limite inférieure correspond à un volume de 2.5cm<sup>3</sup> pendant que les autres volumes présentent une légère toxicité

A partir des matières sèche calculé par chaque fiole de mélasse suta, on va calculés leur moyennes afin de les tracer en fonction du volume de cycloheximide ajouté pour la mélasse suta :

**Tableau n°21**: impact de cycloheximide ajouté à 20ml de la solution de la mélasse suta sur la croissance cellulaire.

Volume de cycloheximide1 dans 100g de mélasse	0	1,25	1,5	1,55	1,6	1,65	1,7	1,75	2	2,25	2.5
Moyenne de matière sèche pour chaque volume de cycloheximide	285,49	181,28	158,98	155,76	151,06	149,01	142,56	140,21	132	121,14	89,76

Le graphe ci –dessous montre la variation de matière sèche en fonction de volume de cycloheximide ajouté à la mélasse suta :



**Graphe n°3 :** variation de la matière sèche moyenne en fonction du volume du cycloheximide ajouté à la mélasse suta.

Le graphe montre comme précédemment la diminution de l'activité enzymatique au fur et à mesure de l'augmentation du volume de cycloheximide par chaque fiole ce qui prouve la toxicité de mélasse à des volumes supérieurs à 2,5 ml.

## 2. Méthode fermento :

Avant de passer à la fixation des limites de toxicité par la nouvelle méthode dite fermento en s'appuyant sur la méthode classique, il faut tout d'abord optimiser un mode opératoire susceptible qui permettra d'obtenir une stabilité de dégagement de CO<sub>2</sub> pendant un temps minimum de 7h.

Pour cela nous avons fait varier la quantité du substrat et de la levure en mg de matière sèche pour les différents types de mélasse.

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

**Tableau n°22:** relevé d'évaluation de stabilité de volume de CO<sub>2</sub> par les différents modes opératoire.

	Nombre d'essai			
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
<b>Quantité de mélasse en (g)</b>	17	8	4	3
<b>Quantité de la levure en (mg de MS)</b>	2.5	25	10	5
<b>Extrait de levure (g)</b>	2	1	0.5	0.11
<b>temps de stabilité pour la mélasse sucrafor (heure)</b>	17	12	9	6.5
<b>temps de stabilité pour la mélasse surac (heure)</b>	17	11	8.5	6.5
<b>temps de stabilité pour la mélasse suta (heure)</b>	17	12	9	7

D'après le mode opératoire n°1, nous déduisons une corrélation notable entre la méthode classique et la méthode fermento. Or notre but est d'atteindre une stabilité pendant un minimum de temps ce qui est remarquable pour le mode opératoire 4, contrairement au 2 et 3 on observe une stabilité de volume de CO<sub>2</sub> pendant un temps plus long.

Donc on peut conclure que le mode adapté parmi ces derniers est le mode opératoire n°4 :

- ✚ 3g de mélasse.
- ✚ 5mg de matière sèche correspond à une prise d'essai de 1.5g de levure fraîche.
- ✚ 0.11 d'extrait de levure.

Cette nouvelle méthode dit fermento est basée sur le calcul de CO<sub>2</sub> dégagé au cours de la fermentation en milieu anaérobie.

Après avoir fixé la limite inférieure et la limite supérieure de toxicité pour les mélasses : SUCRAFOR, SURAC et SUTA par la méthode classique on va appliquer ces mêmes volumes de cycloheximide sur le fermento dans le but d'obtenir un nouveau intervalle de toxicité par le CO<sub>2</sub> dégagé au cours de la fermentation.

## Mélasses sucrafor

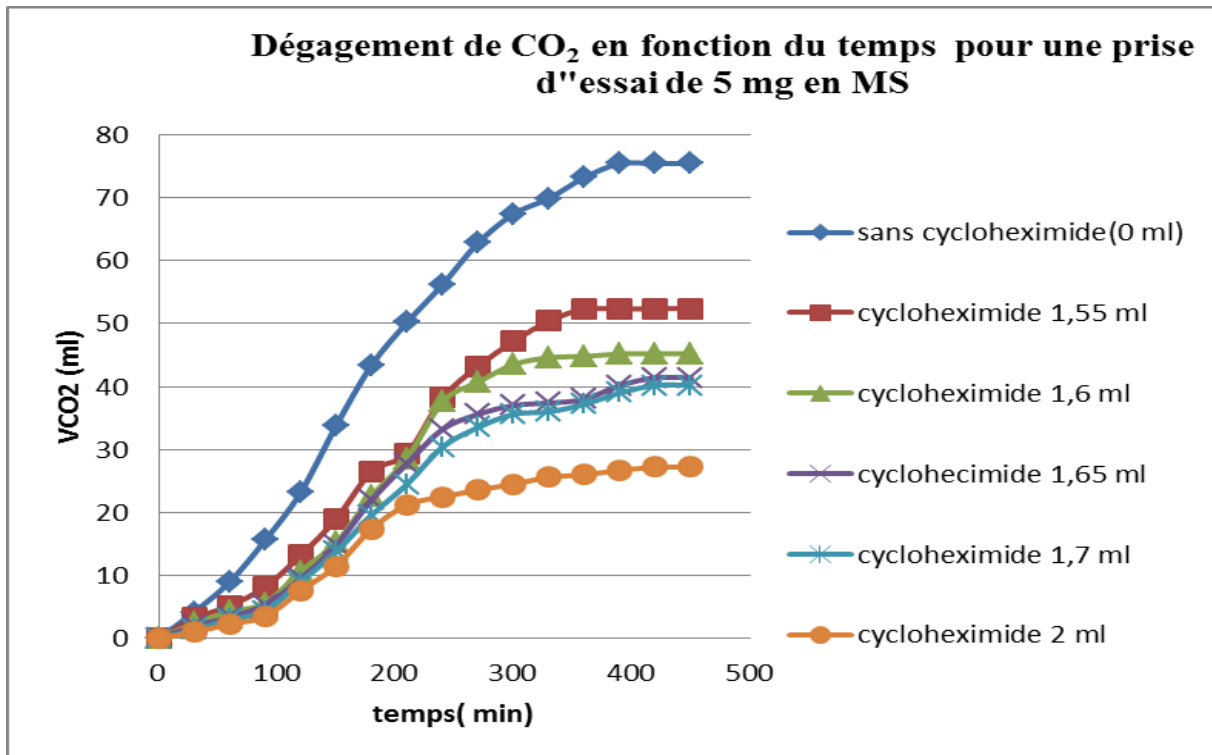
Le tableau en dessous montre les résultats trouvés :

**Tableau n°23** : dégagement de CO<sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de mélasses sucrafor

Temps (min)	Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100g de la mélasses sucrafor					
	0	1.55	1.6	1.65	1.7	2
	Volume de CO <sub>2</sub> dégagé à chaque 30min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	4,2	3,2	2,4	2	1,4	1
60	9	5,2	4,3	3,4	3	2,3
90	19,6	8,2	5,6	5,4	4,4	3,5
120	23,2	13,2	10,7	9,5	9	7,6
150	33,8	19	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	35,6	24,5
330	69,9	50,4	44,6	37,4	36	25,6
360	73,2	52,3	44,8	38	37,2	26
390	75,4	52,3	45,2	40,2	39	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 les résultats trouvés on remarque que la limite supérieure pour la mélasses sucrafor correspond à un volume de 40.2 cm<sup>3</sup> et 27,2 cm<sup>3</sup> pour la limite inférieure. Donc on peut conclure que la limite de toxicité de cette mélasses est comprise entre 27,2 – 40,2 cm<sup>3</sup>.

Après avoir fixé les limites de toxicité pour la mélasse sucrée par le dégagement de CO<sub>2</sub>, on va tracer les courbes présentés ci-dessous pour déterminer les étapes de multiplication de la levure à partir de la phase latence jusqu'à la phase stationnaire pour les différents volumes :



**Graphique n°4 :** variation du volume de CO<sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse sucrée.

Lorsque la levure est réalisée en milieu nutritionnelle les cellules sont dispersés, cela permet de suivre l'évolution de la levure qui proportionnel au volume de CO<sub>2</sub> dégagé en fonction du temps grâce à un fermentomètre.

On observe trois phases distinctes :

### **Phase latence :**

Il s'agit d'une période d'adaptation au cours de laquelle la cellule synthétise 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.

### **Phase de croissance :**

A la suite de la phase de latence survient une phase d'accélération, au cours de laquelle la multiplication cellulaire démarre avec une vitesse spécifique de croissance de plus en plus grande.

Après la phase d'accélération, une multiplication binaire se faisant à vitesse constante, La vitesse de croissance faible au début, subit une forte accélération et devient rapidement importante.

La phase exponentielle ne représente en générale qu'une petite partie d'un cycle complet de la croissance d'une population.

### **Phase stationnaire :**

Stabilité de volume de CO<sub>2</sub>, pendant cette phase l'essentiel de sucre est fermenté, les levures ne se multiplient plus, cette baisse d'activité du à la fois à l'épuisement des nutriments et à l'accumulation des déchets plus ou moins toxiques.

Le graphe montre :

Une phase stationnaire presque observable pour la courbe sans cycloheximide par contre une large phase stationnaire avec l'addition de celui-ci qui est proportionnel à un dégagement de CO<sub>2</sub> plus faible et une meilleure stabilité de cette phase pour les volumes 1.65 ; 1.7 ; 2 ml par rapport au 1.5 et 1.6 ml d'où la notion de toxicité de mélasse.

## Mélasse surac

Les résultats du dégagement de CO<sub>2</sub> mesuré à l'aide d'un fermentomètre après chaque 30min sont regroupés dans le tableau suivant :

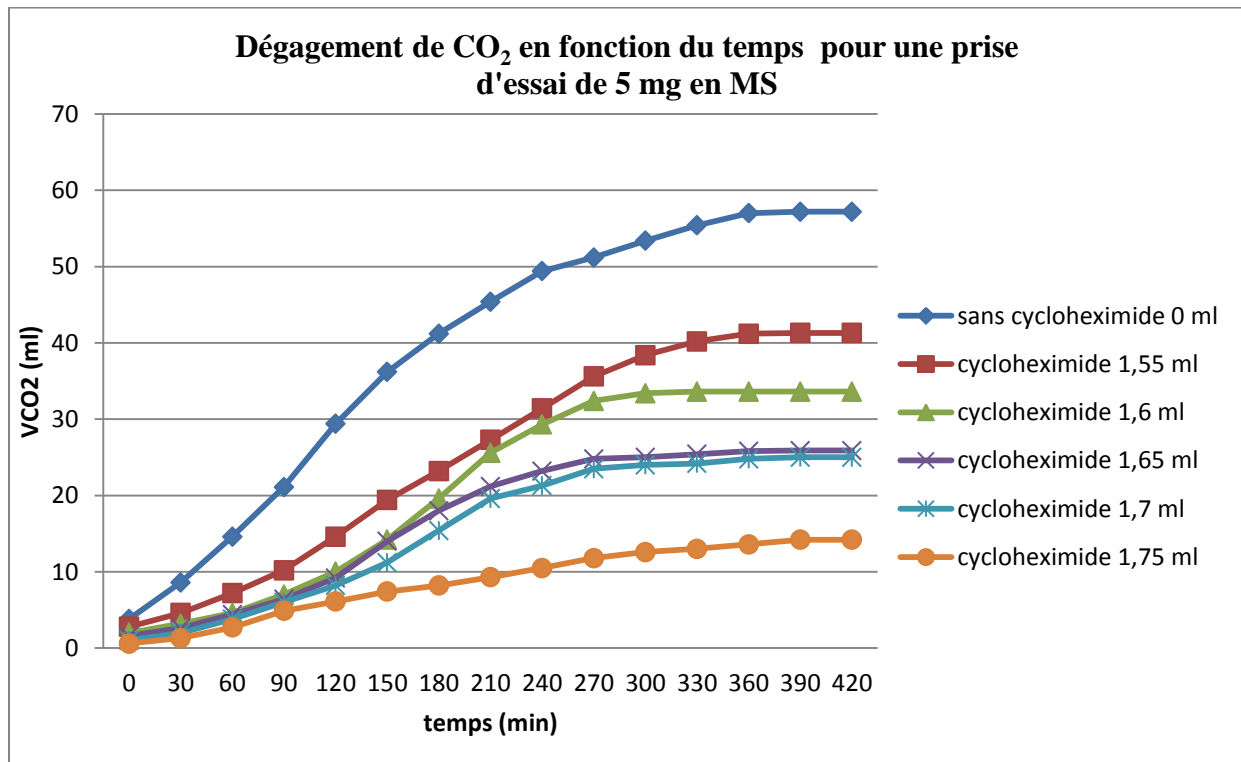
**Tableau n°24** : dégagement de CO<sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse surac.

Temps (min)	Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100g de la mélasse surac					
	0	1.55	1.6	1.65	1.7	1.75
	Volume de CO <sub>2</sub> dégagé à chaque 30min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	3,8	2,8	2	1,6	1	0,6
60	8,6	4,6	3,2	2,6	2	1,3
90	14,6	7,2	4,6	4,4	3,8	2,7
120	21,1	10,2	7	6,4	6	4,9
150	29,4	14,6	10	9,2	8,2	6,1
180	36,2	19,4	14,2	14	11,2	7,4
210	41,2	23,2	19,6	18	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	24	12,6
360	55,4	40,2	33,6	25,4	24,2	13
390	57	41,2	33,6	25,8	24,8	13,6
420	57,2	41,3	33,6	25,9	25	14,2
450	57,2	41,3	33,6	25,9	25	14,2



D'après les résultats trouvés on remarque que la limite supérieure pour la mélasse surac correspond à un volume de 41.3 cm<sup>3</sup> et 14.2 cm<sup>3</sup> pour la limite inférieure. On peut conclure que la limite de toxicité de cette mélasse est comprise entre 14.2-41.3 cm<sup>3</sup>.

Le graphe ci-dessous montre les étapes de multiplication de la levure pour la mélasse surac de la phase latence jusqu'à la phase stationnaire :



**Graph n° 5 :** variation du volume de CO<sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse surac.

Le graphe montre la variation du dégagement de CO<sub>2</sub> par la levure en fonction du temps. Les trois phases citées précédemment devraient être observées au cours de cette fermentation même pour la mélasse surac avec addition de l'inhibiteur (actidione).

D'autre part il montre les mêmes allures que précédemment et meilleur stabilité de phase stationnaire pour les mêmes volumes ce qui confirme la notion de toxicité.

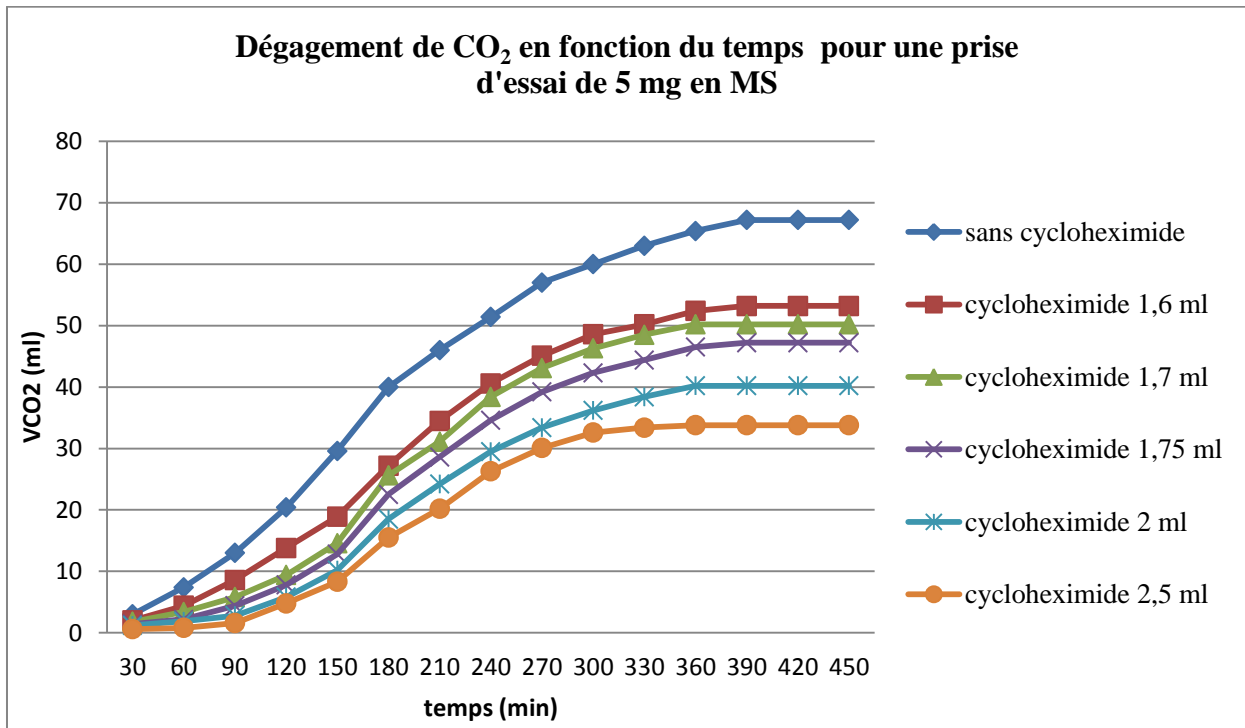
## Mélasse suta

Le tableau ci-dessous montre les résultats du dégagement de CO<sub>2</sub> pour la mélasse suta :

**Tableau n°25:** dégagement de CO<sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse suta

		Volume en ml de cycloheximide ajouté à 100g de la mélasse suta				
Temps (min)	0	1.6	1.7	1.75	2	2.5
	Volume de CO <sub>2</sub> dégagé à chaque 30min pendant 7h de fermentation					
0	0	0	0	0	0	0
30	3	2	1,8	1,4	1,2	0,6
60	7,4	4,4	3,4	2,2	1,87	0,8
90	13	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	27,2	25,6	22,5	18,5	15,5
210	46	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	45,1	43,1	39,2	33,4	30,1
300	60	48,6	46,3	42,3	36,2	32,6
330	63	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 les résultats trouvés on remarque que la limite supérieure pour la mélasse suta correspond à un volume de 47.2 cm<sup>3</sup> et 33.8 cm<sup>3</sup> pour la limite inférieure. on peut conclure que la limite de toxicité de cette mélasse est comprise entre 33.8-47.2 cm<sup>3</sup>.



**Graphe n° 6 :** variation du volume de CO<sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec différent volume de cycloheximide ajouté à la mélasse suta.

- Le graphe montre la variation du dégagement de CO<sub>2</sub> par la levure en fonction du temps. Les trois phases citées précédemment devraient être observées au cours de cette fermentation même pour la mélasse suta avec addition de l'inhibiteur (actidione) par ailleurs on remarque que la phase stationnaire commence dès la 360 min pour les volumes 1.7, 2, 2.5 et à partir de 390 min pour les volumes 1.6 et 1.75.

## 2. Test des sels d'ammonium quaternaire :

Les sels d'ammonium quaternaire sont des composés chimiques constitués en général d'un atome d'azote substitué par 4 groupes alkyles (comportant en général entre 8 et 35 atomes de carbone). Ces composés sont en général plus efficaces à des pH alcalins. Ils sont chargés positivement et se lient sur les sites chargés négativement de la membrane cellulaire, ce qui provoque la mort de la cellule par tension sur les membranes. En diminuant la perméabilité de la membrane.

La présence des sels d'ammonium quaternaire provoque des effets nocifs sur la multiplication de la levure, peuvent aussi inhiber ou éclater la cellule par tension sur la membrane en diminuant la perméabilité de celle-ci.

C'est pour cet effet l'étude est effectuée afin de vérifier qualitativement l'existence ou l'absence des sels d'ammonium dans les différents type de mélasse (canne à sucre et la betterave).ensuite nous avons étalé l'étude sur les différents détergents utilisés pour la désinfection et le nettoyage des fermenteurs à différent dose pour détecter leur effet sur l'activité enzymatique par la méthode classique et fermento.

Les tests réalisés sur les différents types mélasse est expliqué par les images suivantes :



**Figure n°5** : résultat du test sur la mélasse surac (canne à sucre)



**Figure n°6** : résultat du test sur la mélasse sucrafor et suta (betterave)

## D'après le laboratoire de recherche de la SILLE :

S'il y a formation d'un anneau légèrement rose, moyennement rose ou très rose → la mélasse

Contient peu(+) moyennement (++) ou trop (+++) d'ammonium quaternaire, c-à-dire une quantité supérieure à 5ppm d'ammonium quaternaire.

S'il y a formation d'un anneau transparent ou jaune → absence d'ammonium quaternaire

- ✚ D'après les résultats obtenus on observe une coloration légèrement rose au sommet du tube de la mélasse surac d'où la présence des sels d'ammonium quaternaire avec une quantité supérieure à 5 ppm.
- ✚ Les résultats de la mélasse sucrafor et suta montrent une coloration transparente ou légèrement jaunâtre, cela est expliqué par l'absence d'ammonium quaternaire pour les deux mélasses de betterave.

La présence des sels d'ammonium quaternaire dans la mélasse surac peut provenir de plusieurs sources : les détergents utilisés pour la désinfection et le nettoyage, les pesticides...

C'est pour cela, on va étaler notre étude sur les différents détergents utilisés à la société LSAFFRE MAROC (topax, stabimix, p3) qui peuvent constituer la source principale de contamination des différentes mélasses pour détecter leur effet et le degré de toxicité de chaque détergent en s'appuyant sur les 2 méthodes de mesure de toxicité. (Méthode classique et fermento)

### 1. Test de toxicité par la méthode classique :

Les résultats sont reportés dans le tableau suivant :

**Tableau n°26** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor mesurée après 17h de fermentation à différent volume du détergent.

Volume de détergents dans 100g de mélasse	topax		stabimix		P3		témoin
	1ml	5ml	1ml	5ml	1ml	5ml	0 ml
Absorbance(A)	0,024	0,019	0,292	0,020	0,022	0,013	0,341
	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	0,340

**Tableau n°27:** matière sèche récoltée pendant 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrifor à différent volume du détergent.

Volume de détergents dans 100g de mélasse	topax		stabimix		P3		témoin
	1ml	5ml	1ml	5ml	1ml	5ml	0 ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrifor	21,12	16,72	256,96	17,6	19,36	11,44	300,08
	20,24	15,84	256,08	18,48	20,24	11,44	299,2
	21,12	16,72	256,96	18,48	19,36	10,56	299,2

D'après les résultats on constate que le p<sub>3</sub> et le topax présente une toxicité même à un faible volume de 1ml inversement au stabimix on observe une non toxicité au même volume prélevé. On peut conclure que le détergent le moins nocif et le plus conseillé à utiliser au sein de la société lessafre maroc est stabimix.

## 2. test de toxicité par la méthode fermento :

Après avoir détecté le degré de toxicité de chaque détergent par la méthode classique, nous allons appliquer le même test par la méthode fermento afin de prouver les résultats obtenus et savoir l'effet de chaque détergent après chaque 15min.

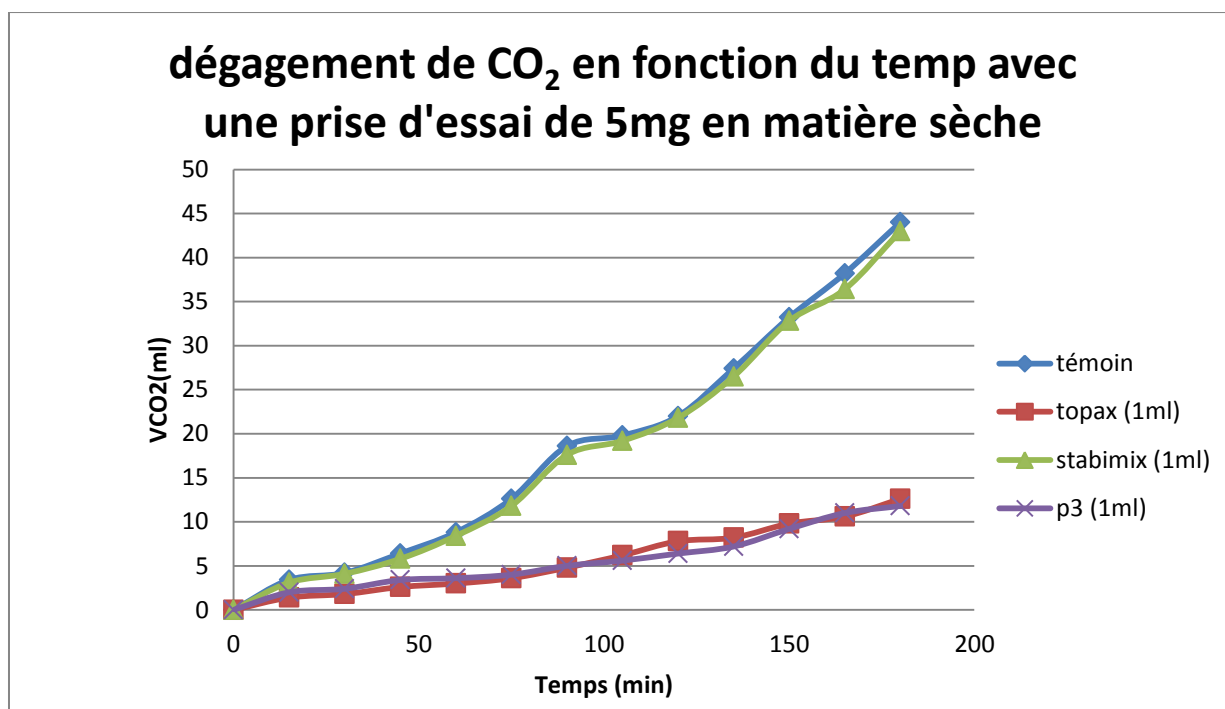
**Tableau n°28 :** dégagement de CO<sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrifor.

	Type des détergents						
	Sans détergent	topax		stabimix		P3	
Temps (min)	Volume en ml du différent détergent ajouté à 100 g de la mélasse sucrifor						
	0	1	5	1	5	1	5
	Volume de CO <sub>2</sub> dégagé à chaque 15 min pendant 3h de fermentation						
0	0	0	0	0	0	0	0
15	3,4	1,4	1	3,1	2,2	2	1,4
30	4,2	1,8	1,2	4,1	3,6	2,4	2
45	6,4	2,6	1,3	5,8	4	3,4	2

60	8,8	3	1,4	8,4	6	3,6	2
75	12,6	3,6	1,4	11,8	6,5	4	2
90	18,6	4,8	1,4	17,6	7	5	2
105	19,8	6,2	1,4	19,2	7,2	5,6	2,4
120	22	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	2,4
180	44	12,6	1,4	43	7,2	11,2	2,4

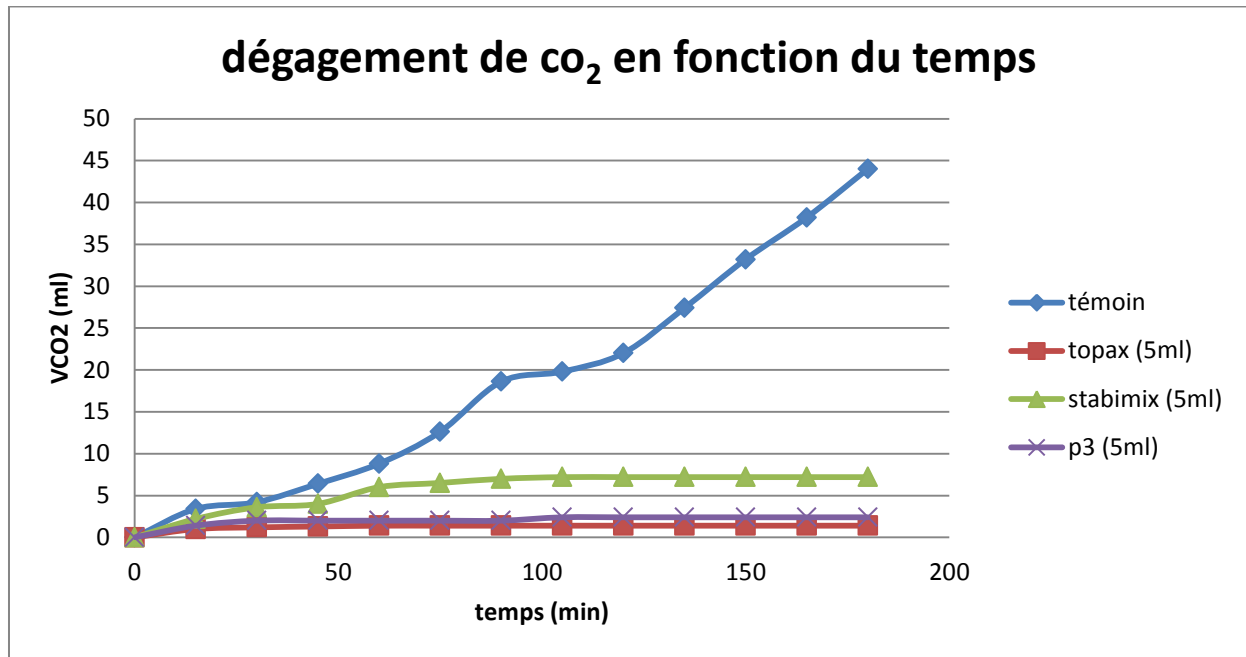
- Les résultats obtenus par la méthode fermento sont homologues à la méthode classique, on remarque que le P<sub>3</sub> et topax ont un dégagement de CO<sub>2</sub> plus faible par rapport au stabimix à un volume de 1ml cela signifie qu'ils ont un effet même à faible volume, mais par l'ajout de 5ml des différents détergents on observe une inhibition dès les premiers 30min pour P<sub>3</sub>, à 60 min pour topax et à 105 min pour stabimix d'où leur forte influence sur l'activité enzymatique au premier temps du métabolisme.

Les graphes ci-dessous illustrent les résultats cités dans le tableau précédent :



**Graphe n°7 :** variation du volume de CO<sub>2</sub> dégagé en fonction du temps avec un volume de 1ml des différents détergents ajoutés à la mélasse sucrée.

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 CO<sub>2</sub> plus faible.



**Graphe n°8** : variation du dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction du temps avec les différents détergents à un volume de 5ml

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



### 3. Influence de quelques inhibiteurs sur l'activité enzymatique:

Les levures utilisent généralement le saccharose du milieu nutritif pour se développer, afin d'assimiler ce nutriment la levure produit  $\beta$ -fructosidase ou invertase qui va hydrolyser le saccharose en (glucose et fructose). Néanmoins, elle peut hydrolyser d'autres fructofuranosides comme le raffinose (triholoside constitué de galactose, glucose et fructose) et le stachyose (tétra saccharide :  $\alpha$  D-galactopyranosyl (-6)- $\alpha$  D-galactopyranosyl (1-6)  $\alpha$ -D-gluco-pyranosyl (1-2)- $\beta$ -D-fructofuranoside).

L'inhibition de cette enzyme peut être produite par plusieurs éléments nuisibles en raison de leur concentration.

Dans ce test, on étudie l'effet du sulphate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) à différentes concentrations sur l'activité enzymatique de l'invertase de la levure de boulangerie. Cette inhibition est liée à l'affinité que présente  $\text{Cu}^{2+}$  envers les groupes sulfhydryle des acides aminés cystéines et méthionine de l'enzyme (Greenwood Health Systems, 2009), par ailleurs nous avons évalué de même l'influence de  $\text{Pb}^{2+}$  (qui touche les histidines de la chaîne latérale de l'enzyme et rendent cette dernière inactive) et le bisulfite existant dans la mélasse sur la multiplication de la levure.

Les résultats des absorbance trouvés par la méthode classique sur les différents inhibiteurs sont regroupés sur le tableau suivant :

**Tableau n°29** : absorbance d'une prise d'essai de 2.5mg de MS par 20ml de la solution de la mélasse sucrée mesurée après 17h de fermentation à différents volumes d'inhibiteur ajoutés.

Volume d'inhibiteur dans 100g de mélasse	témoin	$\text{CuSO}_4$			$(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Pb.Pb}(\text{OH})_2$			$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$		
	0ml	0.5ml	1.5ml	3ml	0.5m	1.5ml	3ml	0.5ml	1.5ml	3ml
Absorbance	0,324	0,210	0,196	0,124	0,245	0,206	0,186	0,187	0,106	0,096
	0,322	0,209	0,197	0,124	0,243	0,207	0,185	0,186	0,105	0,099
	0,324	0,210	0,195	0,122	0,244	0,205	0,183	0,187	0,106	0,098

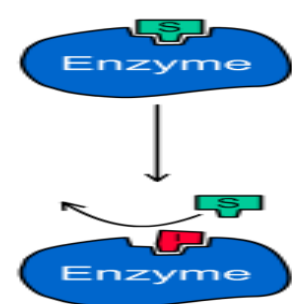
Les résultats de calculs de quantité de levure en mg de matière sèche sont rassemblés sur le tableau ci-dessous :

**Tableau n°30 :** matière sèche récoltée pendant 17h de fermentation par 20ml de la solution de la mélasse sucrador à différent volume d'inhibiteur ajouté.

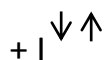
Volume d'inhibiteur dans 100g de mélasse	témoin	CuSO <sub>4</sub>			(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Pb.Pb(OH) <sub>2</sub>			Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		
	0ml	0.5ml	1.5ml	3ml	0.5m	1.5ml	3ml	0.5ml	1.5ml	3ml
quantité de levure en mg de matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrador	285,12	184,8	172,48	109,12	215,6	181,28	163,68	164,56	93,28	84,48
	283,36	183,92	173,36	109,12	213,84	182,16	162,88	163,68	92,4	87,12
	285,12	184,8	171,6	107,36	214,72	180,4	161,04	164,56	93,28	86,24

Les concentrations seuils au-delà desquelles des effets néfastes sont observés sont en général supérieures pour les bisulfites et le sulfate de cuivre, donc ils peuvent inhiber l'activité enzymatique. Contrairement à l'hydroxy d'acétate de plomb même à des concentrations plus élevées n'a pas d'impact sur la croissance cellulaire.

L'inhibition par le sulfate de cuivre est expliquée par l'association de ce dernier d'une manière réversible à l'invertase, alors il occupe la place de substrat sur le site actif de l'enzyme (diminution de l'affinité du substrat pour l'enzyme) sans formation d'un complexe ternaire (cas d'un inhibiteur réversible compétitif).



Inhibition compétitive



Inhibiteur compétitif possède généralement une ressemblance structurale avec le substrat et tous deux entrent en compétition pour se fixer sur le même site enzymatique.

Après avoir détecté l'effet des différents inhibiteurs par la méthode classique, nous allons suivre le même test par la nouvelle méthode dite fermento définie par le dégagement de CO<sub>2</sub> pour prouver les résultats obtenus par la méthode classique.

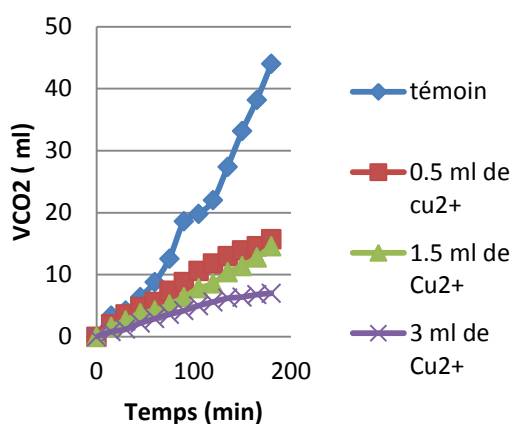
## Test Fermento :

**Tableau n°31** : dégagement de CO<sub>2</sub> d'une prise d'essai de 5 mg en matière sèche par 20ml de la solution de la mélasse sucrafor à différent volume d'inhibiteur.

Temps (min)	Type d'inhibiteurs									
		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>			CuSO <sub>4</sub>			(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Pb.Pb(OH) <sub>2</sub>		
	Volume en ml des différents inhibiteurs ajouté à 100 g de la mélasse sucrafor									
	0	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3
Volume de CO <sub>2</sub> dégagé à chaque 15 min pendant 3h 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	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	40,2	38,6	34,6

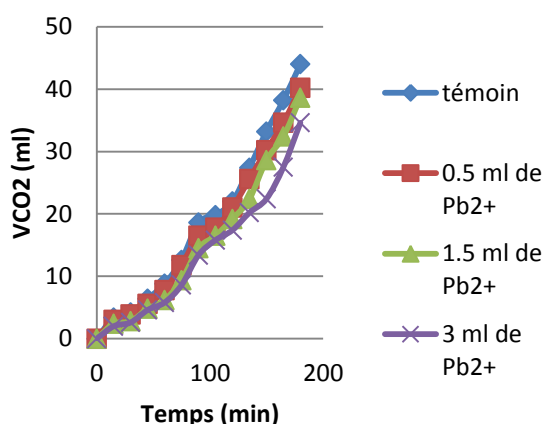
D'après le tableau, on observe une corrélation des résultats entre la méthode classique et la méthode fermento.

### dégagement du CO<sub>2</sub> en fonction du temps



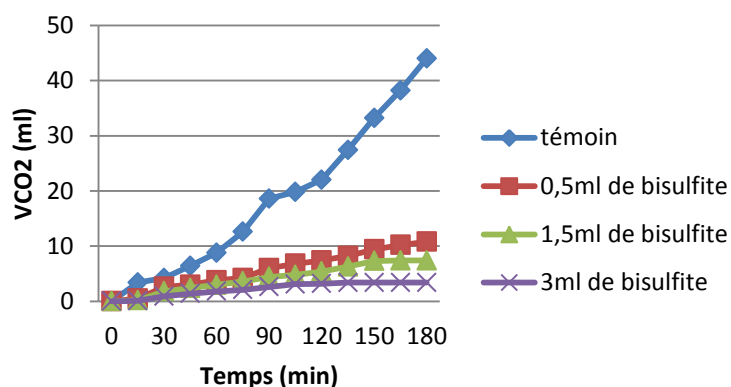
**Graphe n°9** : variation du dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de CuSO<sub>4</sub>

### dégagement du CO<sub>2</sub> en fonction du temps



**Graphe n°10** : variation du dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Pb.Pb(OH)<sub>2</sub>

### dégagement du CO<sub>2</sub> en fonction du temps



**Graphe n°11** : variation du dégagement de CO<sub>2</sub> en fonction du temps à différent volume de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

Les valeurs du dégagement de CO<sub>2</sub> trouvés sur le tableau précédent nous montrent que le bisulfite et le cuivre (II) ont un effet puissant sur la croissance cellulaire contrairement au plomb(II), ce qui est observable sur les trois graphes par les allures des courbes.

## CONCLUSION TECHNIQUE

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

Le test de toxicité par cette nouvelle méthode dite méthode fermento nous a permis de suivre l'évolution de la courbe de  $V_{CO_2}$  dégagé, cela pour trois raisons principales :

- ✚ Fixer l'intervalle de limite de toxicité pour les différents types de mélasse soit la canne à sucre soit la betterave
- ✚ Détecter l'effet de la toxicité de mélasse sur l'activité enzymatique qui est lié directement à la stabilité de  $V_{CO_2}$
- ✚ Minimiser le temps par la substitution de la méthode classique par cette nouvelle méthode dite fermento.

On est donc arrivé aux conclusions suivantes :

- ✚ Un mode opératoire convenable pour la nouvelle méthode définie par la stabilité du volume de  $CO_2$  pendant 7h fermentation.
- ✚ En se basant sur la méthode classique, le test avec une concentration de 0.001% de cycloheximide nous donne des résultats satisfaisants et cohérents avec toutes les mélasses.
- ✚ L'intervalle de limite de toxicité par le dégagement de  $V_{CO_2}$  pour les différents types de mélasse est compris entre « **14.2ml-47.2ml** »
- ✚ L'impact des différents détergents utilisé au nettoyage (contenant les sels d'ammonium quaternaire) et les éléments nuisibles à différentes concentrations sur la multiplication cellulaire.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La qualité et la sécurité alimentaire restent une préoccupation permanente des industries agroalimentaires et le souci de fournir aux consommateurs des produits sains, satisfaisant leurs besoins.

Pour satisfaire toute cette clientèle nombreuse et exigeante, **Lesaffre Maroc** doit mettre en œuvre de nouvelles stratégies en termes de qualité et de temps ; temps parce que comme on le dit TIME IS MONEY pour l'entreprise et qualité en ce qui concerne le produit final (levure).

C'est dans ce sens que Lesaffre Maroc s'inscrit dans ce même contexte et recherche, donc gain de temps, qualité et satisfaction de son client. C'est pour quoi elle développe en interne les capacités nécessaires pour offrir des produits de qualité constante.

Au terme de ce stage, pour tous les tests que nous avons effectué, nous pouvons affirmer que notre objectif est atteint par la substitution de la méthode classique par la méthode fermento, de plus l'évolution de la courbe du  $VCO_2$  dégagé a été la même pour les mélasses toxiques c'est-à-dire qu'on a toujours observé une stabilisation de la courbe après un certain temps de croissance. Cette stabilisation de la courbe nous montre l'effet de la toxicité sur le pouvoir fermentative de la levure et par conséquent blocage de la multiplication de levure au niveau de la production.

Nous avons montré aussi d'après les tests effectués sur les différents détergents (qui sont à base des ammoniums quaternaires) utilisés au sein de la société **LESAFFR** parmi lesquels stabimix est le meilleur à utiliser pour le nettoyage.

A la lumière des analyses faites, le bilan de ce stage s'avère extrêmement positif, car il m'a permis de perfectionner et de confronter mes connaissances théoriques, les relations interpersonnelles, une méthode de travail et de la discipline de soi. Il m'a permis d'améliorer mes connaissances en matière d'évaluation analytique par les méthodes chimiques d'un procédé. Toutes ces connaissances viennent s'ajouter à celles acquises durant notre formation.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[2] HENCKÉ Stéphanie «Utilisation alimentaire des levures» l'université HENRI POINCARÉ - NANCY I, Faculté de pharmacie, 2000,

[3] Hubert OLBRICH, Fermentation technologist, Institut für Zuckerindustrie, Berlin (Germany), 1963

[4] Alnajar asmae radouane mohamed « preparation et etude cinétique de la  $\beta$ -fructosidase de levure (saccharomyces cerviciae) soluble et immobilisée » université ABOUBEKR – TLEMCEN, Faculté des sciences, Département de biologie ,2001,

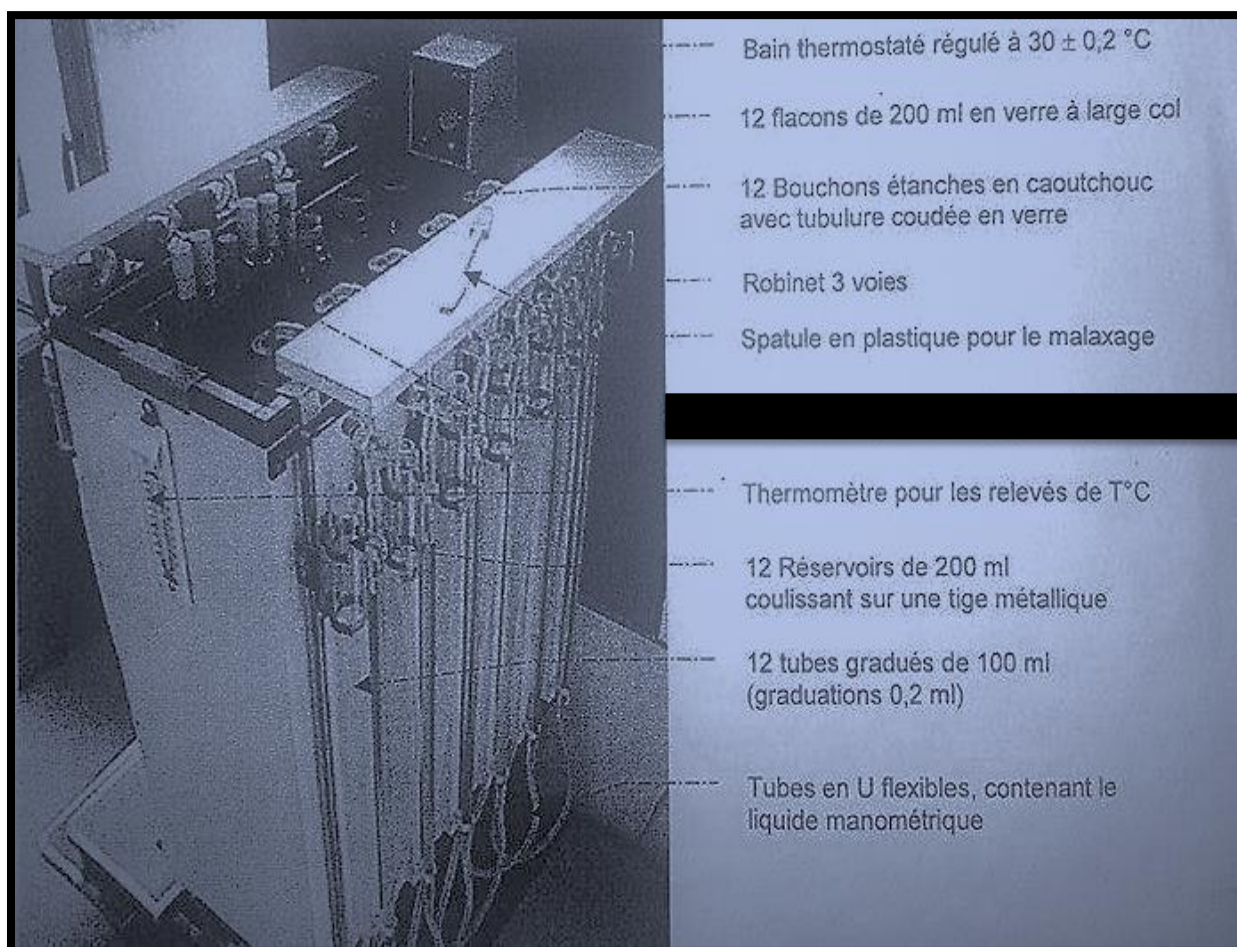
[5] BOURAS Hanane, Bourega Asma et Khineche Saida «Influence des facteurs physiologique et nutritionnels sur la production de la biomasse (levure boulanger) », Faculté Des Sciences et Sciences de l'ingénieur, Université de KASDI MERBAH-Ouargla, 2006

<http://www.lesaffre.com/fr/>

<http://www.arcane-industries.fr/details-ammonium+quaternaire-114.html>

<http://www.francemelasses.net/index.asp?id=407>

## Annexe 1 : description du fermentomètre.



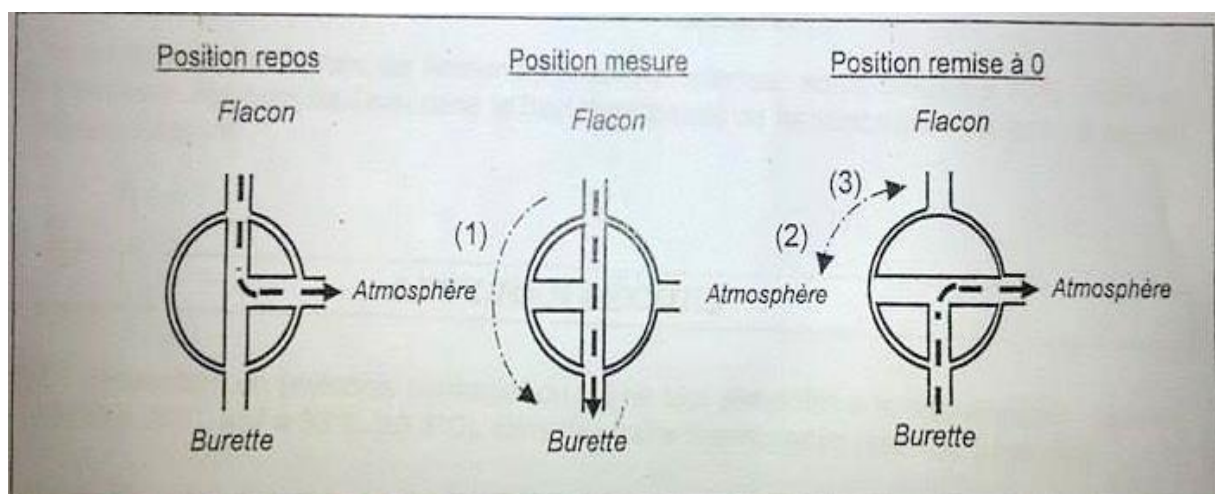
- + L'appareil doit se trouver dans une pièce climatisée à  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , à l'abri des courants d'air, de la chaleur et de la lumière directe du soleil.
- + Le bain thermostaté doit être à  $30 \pm 0,2^\circ\text{C}$  et contrôler à l'aide d'un thermomètre de précision connue.
- + Le niveau du liquide manométrique doit être tel que quand le réservoir est en position haute, le niveau dans la burette se trouve au-dessus du zéro. (pour respecter cette conditions il est conseillé de remplir chaque tube avec 165ml de liquide.

### Schéma explicatif de la mise en pression :

- + Vérifier que le robinet 3 voies du 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.

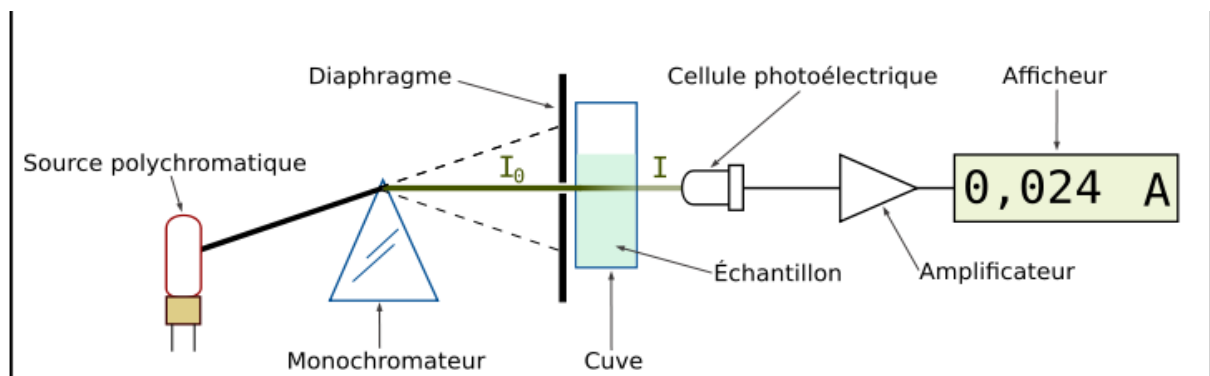
## Annexe 2 : détermination de l'absorbance ou de la densité optique d'une substance chimique.

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 Beer-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.



## Spéctrophotomètre



Un spectrophotomètre mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer, à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette, une lumière monochromatique, dont la longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. La lumière monochromatique incidente d'intensité  $I_0$  traverse alors une cuve contenant la solution étudiée, et l'appareil mesure l'intensité  $I$  de la lumière transmise. La valeur affichée par le spectrophotomètre est l'absorbance à la longueur d'onde étudiée. Le spectrophotomètre peut être utilisé pour mesurer de manière instantanée une absorbance à une longueur d'onde donnée, ou pour produire un spectre d'absorbance (spectrophotomètre à balayage). Dans ce dernier cas, le dispositif monochromateur décrit en un temps court l'ensemble des longueurs d'onde comprises entre deux valeurs choisies par l'opérateur.