

## Liste d'abréviation

**Ac** : acide.

**BPH** : Bonnes pratiques d'hygiène.

**C** : criticité.

**CCP**: Critical Control Point.

**CEE**: Communauté économique européenne.

**FAR** : forces armées royales.

**GNG** : gélose nutritive gélosée.

**HACCP** : Hazard Analysis Critical Control Point.

**ISO** : Organisation internationale de normalisation (International Organization for Standardization).

**MAP**: Monoammonium phosphate.

**N** : nombre de microorganismes par ml d'échantillon.

**NASA** : National Aeronautics and Space Administration.

**OTR** : oxygen transfer rate.

**OUR** : oxygen uptake rate.

**PC** : pas de contamination.

**PP**: programmes préalables.

**Q n** : question numéro n.

**SPH**: levure sèche active.

**SPI**: levure sèche instantanée.

**T°** : température.

**Tps** : temps.

**UFC** : unité formant colonie.

**UV** : ultraviolet-visible.

**V** : volume.

**Rdt** : rendement.

## Liste des figures

Figure 1: Saccharomyces cerevisiae [29] .....	8
Figure 2: cycle biologique de Saccharomyces cerevisiae [1] .....	10
Figure 3: bourgeonnement Saccharomyces cerevisiae .....	10
Figure 4: La conjugaison de deux cellules haploïdes .....	11
Figure 5: schéma du circuit de préparation des sels nutritif .....	25
Figure 6: l'appareil de minéralisation .....	28
Figure 7: l'appareil de distillation.....	28
Figure 8: Histogramme de la variation du teneur d'azote g/100ml dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation .....	40
Figure 9: Histogramme de la variation de pH dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation .....	40
Figure 10: Histogramme de la variation de conductivité en $\mu\text{S}/\text{cm}$ dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation .....	41
Figure 11: Histogramme de la variation du teneur d'azote en g/100ml de solution de MAP en fonction de stade de préparation.....	42
Figure 12: Histogramme de la variation du teneur $\text{P}_2\text{O}_5$ en g/100ml de solution de MAP en fonction de stade de préparation.....	42
Figure 13: Histogramme de la variation de pH dans la solution de MAP en fonction de stade de préparation .....	43
Figure 14: Histogramme de la variation de conductivité en $\mu\text{S}/\text{cm}$ dans la solution de MAP en fonction de stade de préparation.....	43
Figure 15: Histogramme de la variation du teneur d'azote en g/100ml dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation .....	44
Figure 16: Histogramme de la variation de pH dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation .....	45
Figure 17: Histogramme de la variation de conductivité en $\mu\text{S}/\text{cm}$ dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation .....	45
Figure 18: Histogramme de résultats des analyses microbiologique en UFC en fonction de stade de préparation .....	46
Figure 19: Photo de la Bacillus .....	46
Figure 20: diagramme radar du % de conformité par chapitre. ....	49
Figure 21: arbre de décision pour déterminer les CCP .....	53

## Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques biochimiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [1].....	9
Tableau 2:les analyses microbiologiques.....	30
Tableau 3: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de préparation .....	31
Tableau 4: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de stockage.....	32
Tableau 5: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de fermenteur .....	33
Tableau 6: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de préparation .....	34
Tableau 7: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de stockage .....	35
Tableau 8: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de fermenteur.....	36
<b>Tableau 9:</b> résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de <b>sulfate d'ammonium</b> au stade de <b>préparation</b> .....	37
Tableau 10: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de <b>sulfate d'ammonium</b> au stade de stockage .....	38
Tableau 11: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de <b>sulfate d'ammonium</b> au stade de fermenteur .....	39
Tableau 12:pourcentage de satisfaction des programmes préalables .....	48
Tableau 13: identifications des dangers dans le circuit des sels nutritifs .....	50
Tableau 14:critères d'évaluation des dangers.....	51
Tableau 15:évaluation des dangers dans le circuit des sels nutritifs.....	51
Tableau 16:détermination des CCP dans le circuit des sels nutritifs .....	54

# Sommaire

Introduction .....	2
Avant-propos .....	4
I-    Présentation de LESAFFRE .....	4
II-    Historique de la société le SAFFRE Maroc.....	4
III-    Procédé de fabrication de la levure à LESAFFRE Maroc .....	5
Partie I : Etude bibliographique .....	8
I-    étude fondamentale des levures .....	8
I-1- Morphologie des levures.....	8
I-2- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	8
I-3- Multiplication <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
I-4- Procédés aérobies de production des levures .....	11
I-5- Procédé de Fermentation anaérobie de levure .....	12
1-6 La fermentation en semi-continu et les Paramètres à contrôler.....	12
II-    Les levures : leurs utilisations en alimentation humain et dans l'industrie agro-alimentaires. ....	14
II-1- levure et l'industrie agro-alimentaires.....	14
II-2- Paramètres influençant l'activité levuriennes [8] .....	15
III-    Le rôle de la levure dans la fabrication du pain .....	16
IV-    population contaminants altérant la qualité sanitaire et marchande.....	17
IV-1- Flore totale aérobie mésophile.....	17
IV-2- Coliformes totaux.....	17
IV-3- Levures sauvages .....	18
IV-4- Moisissures .....	18
IV-5-Les normes de levure de boulangerie.....	18
V-    Méthodes de quantification des populations contaminants.....	18
V-1- Méthode standard : culture dans la masse d'en milieu gélosé.....	19
V-2- Dénombrement après cultures .....	19
V-3- Choix des conditions d'incubation .....	19
V-3-1- température d'incubation .....	19
V-3-2- durée d'incubation .....	20
V-4- Observations microscopiques .....	20
VI-    Les sels nutritifs .....	20

VII- Management de la sécurité .....	21
Partie II : Etudes pratiques.....	24
I- Les sels nutritifs.....	24
I-1- L'urée.....	24
I-2- sulfate d'ammonium .....	24
I-3- Monoammonium phosphate .....	24
I-4- Les étapes du traitement des sels nutritifs .....	25
II- Matériel et méthode .....	27
II- 1- les analyses physico-chimiques.....	27
II-1-1- Dosage d'azote.....	27
II-1-2- Dosage de taux du phosphore .....	29
II-1-3- Dosage de pH et conductivité .....	29
II-2- les analyses microbiologiques.....	30
III- Résultat :.....	31
III-1- Urée.....	31
III-2- Mono-ammonium phosphate.....	34
III-3- Sulfate d'ammonium.....	37
IV- Interprétation.....	40
IV-1- Urée.....	40
IV-2- Mono-ammonium phosphate.....	41
IV-3- Sulfate d'ammonium .....	44
V- Management de la sécurité .....	47
V-1- Engagement et politique qualité .....	47
V-2- Gestion du manuel qualité.....	47
V-3- Equipe HACCP .....	47
V-4- Diagnostic des programmes préalables.....	47
V-4-1- Analyse de conformité .....	48
V-4-2- Les mesures correctives .....	49
V-5- Analyse des dangers.....	50
V-5-1- Identification des dangers.....	50
V-5-2- Evaluation quantitative et qualitative des dangers .....	51
V-6- Détermination des points critiques .....	52
V-7- Vérification du système HACCP .....	54

V-8- Documentation .....	55
Conclusion.....	56

## Introduction

L'origine de la fabrication de la levure remonte au moins à l'Egypte ancienne où nous trouvons certains récits parlant débouillies de grain liquides que des boulanger plaçaient dans un endroit frais et qu'ils utilisaient lorsque la formation de bulles de gaz faisait mousser le liquide. Actuellement les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à la fabrication de nombreux produits : brasserie, cidrerie, vinification, fromagerie et panification, et aussi à la valorisation agricoles et industriels et à la production des protéines.

La législation alimentaire a connu une grande évolution suite à la mondialisation du secteur agroalimentaire et à l'augmentation des accords de libres échanges entre les pays. Le législateur impose le recours à des méthodes de contrôle des points critiques afin d'assurer la santé des consommateurs. Parmi ses méthodes on trouve la méthode communément appelée HACCP. Par point critique, on entend toute opération dans le processus qui, non ou mal maîtrisée, peut entraîner une conséquence, plus ou moins grave, au niveau de la santé du consommateur. Pour s'assurer de la maîtrise de ces points critiques, des règles sont à respecter (les règles de bonnes pratiques de fabrication et les règles de bonnes pratiques d'hygiène); le respect de ces règles est contrôlé, et les non-conformités sont corrigées.

Le respect de ces critères, en particulier microbiologique, nécessite des contrôles pratiqués tant sur les matières premières, les produits en cours de fabrication et les produit finis, que sur les locaux et le personnel. Les contrôles en industrie alimentaire sont deux types : Soit ils sont diligentés par des organismes administratifs ou des associations afin de contrôler la conformité à un critère établi, d'une matière première ou d'un produit fini mis sur le marché. Soit ils sont décidés au sein de l'entreprise et concernent certaines étapes de la fabrication du produit : ce sont les autocontrôles. Ces autocontrôles sont effectués par des laboratoires internes à l'entreprise.

C'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de fin d'études qui a pour mission de contribuer à la mise à jour de norme HACCP dans le circuit des sels nutritifs, par le suivi et maîtrise des sels nutritifs et la revalidation des programmes préalables et le système HACCP dans le circuit des sels nutritif.

Ce manuscrit sera composé de trois parties :

- ✓ Une partie relatant l'historique de la levure et son processus de production.
- ✓ Une seconde partie exposant l'étude bibliographique qui décrire étude fondamentale de la levure et ces différents utilisation. Expliquer le concept qualité de système HACCP et les outils et méthodes utilisées pour cette étude.

- ✓ Une troisième partie consiste à un suivi physico-chimique et microbiologique des sels nutritifs de la préparation jusqu'à fermentation. et la maîtrise du BPH et CCP tout au long de circuit des sels nutritifs pour la revalidation de HACCP.

## Ayant-propos

### I- Présentation de LESAFFRE.

**1853 :** Louis Lesaffre-Roussel et Louis Bonduelle-Dalle créent une distillerie d'alcool de grains et de genièvre à Marquette-lez-Lille.

**1863 :** Acquisition du premier moulin à Marcq-en-Barœul. C'est à partir de ce site que se développera la Société Industrielle Lesaffre qui se révélera progressivement comme l'élément moteur et le support de l'essor industriel et commercial de la branche levure du Groupe.

**1871 :** Le baron autrichien Max de Springer, propriétaire à Maisons-Alfort d'une très belle distillerie, rapporte de chez Mautner, à Vienne, l'idée d'extraire la levure des moûts de fermentation des grains et de la vendre aux boulangers. Ces derniers, à cette époque, utilisaient leurs propres levains, accompagnés parfois de levure résiduaire de brasserie.

**1873 :** Lesaffre & Bonduelle développent la fabrication de levure fraîche à Marcq-en-Barœul, à la place de l'ancien moulin.

**1895 :** Naissance de la marque de levure l'hirondelle. Une hirondelle dont le dessin va évoluer au fil du temps, jusqu'à devenir l'emblème du Groupe en 2003.

**1901 :** Les familles Lesaffre et Bonduelle décident de poursuivre séparément leurs activités. L'entreprise est partagée en 3 branches : Bonduelle, Lesaffre & Cie (alcool et levure) et Lesaffre Frères (sucrerie et distillerie). [5]

### II- Historique de la société le SAFFRE Maroc.

En 1993, la société SODERS a été majoritairement détenue par le groupe Français LESAFRRE et portant aujourd'hui comme nouvelle appellation « LESAFFRE Maroc », elle présente la première entreprise privatisée du Maroc bénéficiant de l'expérience et de l'expertise du leader mondial dans la fabrication de la levure de panification.

LESAFFRE Maroc fabrique et commercialise de la levure : les marques, **Jaouda** comme levure fraîche, **Rafiaa** et **Nevada** comme levure sèche, ajoutant à cela un type spécial destiné et fabriqué pour saturer les besoins des forces armées royales (FAR) en levure, ainsi que des améliorants de panification : les marques **Ibis bleu** et **Magimix**. [6]

### **III- Procédé de fabrication de la levure à LESAFFRE Maroc**

La production de levure repose sur l'association d'utilisation des souches de levure sélectionnées et de procédés industriels spécifique. La production est réalisée en plusieurs étapes successives. (figure 2)

- **Ensemencement**

Chaque mois la société LESAFFRE Maroc reçoit de la France une seule souche de *Saccharomyces cerevisiae*, destinée à la production du levure. Cette souche est ensemencée dans 30 à 37 tubes remplis par la gélose nutritive spécifique à la croissance et qui permet la régénération des levures, dans des conditions strictement aseptiques.

Chaque jour le contenu d'un tube est transvasé dans deux petits ballons appelés « Van Lear » de 250ml, qui contient un milieu riche en extrait de levures et en saccharose.

Le contenu de chaque « Van Lear » est versé dans un ballon appelé « Caelesberg » de 7 l.

- **Cuve 800 l**

La levure préparée est mise dans une cuve de 800 l, pour être adaptée, pour la première fois, à la mélasse comme source du carbone. Jusqu'à ce stade la fermentation se fait selon le procédé discontinu.

- **Pré-fermentation**

Le continu de la cuve 800 l est versé dans un pré-fermenteur, et l'ajout des éléments nutritif, eau mélasse stérile, sels minéraux, oligo-éléments et vitamines, se fait de manière semi-continu selon les besoins.

- **Fermenteur**

A la fin de pré-fermentation, on obtient un moût qui servira à ensemencer le fermenteur. Après 18 à 20 heures de fermentation en culture semi-continue( fed-batch), on obtient de la levure mère. Cette dernière va subir une séparation, et elle va servir à l'ensemencement des fermenteurs de plus grands tailles, pour donner à la fin la levure commerciale.

- **Séparation**

La séparation s'effectuée en deux étapes de procédé : Après l'obtentioin de la levure mère et après l'obtentioin de la levure commerciale.

Le principe repose sur la séparation des cellules de levures des restes du milieu nutritif par centrifugation. On obtient un liquide léger : le moût déluveré, et un liquide dense : la crème.

- **Stockage de la crème**

La crème obtenue est stocké dans des cylindres à 4 °C, où il va subira une addition de :

- L'acide sulfurique à pH=2 pour éviter la contamination ;
- Le sel : qui joue un rôle important dans l'extraction d'eau des cellules de levure par différence de pression osmotique.

- **Filtration**

Cette étape consiste à extraire l'eau présente dans la levure. La crème sera, donc, filtrée sur des filtres rotatifs sous vide, munis d'une toile préalablement enduite d'amidon pour éviter le colmatage, puis, la pâte de levure est recueillie dans des cuves de stockage.

Cette phase essentielle permet de passer d'une crème de levure à 22% de matière sèche à un gâteau de levure à 32% de matière sèche, donnant après boudinage la levure bien friable que le boulanger recherche.

L'eau extraite est refoulé vers l'extérieur par une pompe d'évacuation.

- **Conditionnement**

- **Levure fraîche**

Le boudin de levure pressée est découpé en pain de 500g, qu'on enveloppe individuellement dans un papier paraffiné. Après mise en carton, la levure est conservée en chambre froide afin d'être réfrigérée à cœur avant son expédition.

- **Levure sèche :**

Pour la levure sèche, le gâteau provenant de la filtration sous vide est mélangé avec une quantité d'émulsifiant qui sert à conserver le produit plus longtemps et donne aussi la couleur blanche caractéristique de la levure.

Le gâteau obtenu est transformé en vermicelle à l'aide d'une grille de porosité connue, ensuite elle est transférée au sécheur par une conduite vibratoire afin d'éliminer le maximum d'eau restant dans la cellule sans l'endommager, tout en augmentant le taux de matière sèche jusqu'à 94% pour la SPH et 95.5% pour la SPI.

**SPI :** levure sèche instantanée sous forme de petits bâtons fissurés emballées sous vide dans des sachets de 450g ainsi que dans des cartons de 25kg destinés à l'export.

**SPH :** levure sèche active ou à réhydratation sous forme de granules ou de sphérolites, emballées sous air dans des sachets de 50g, 100g et 500g

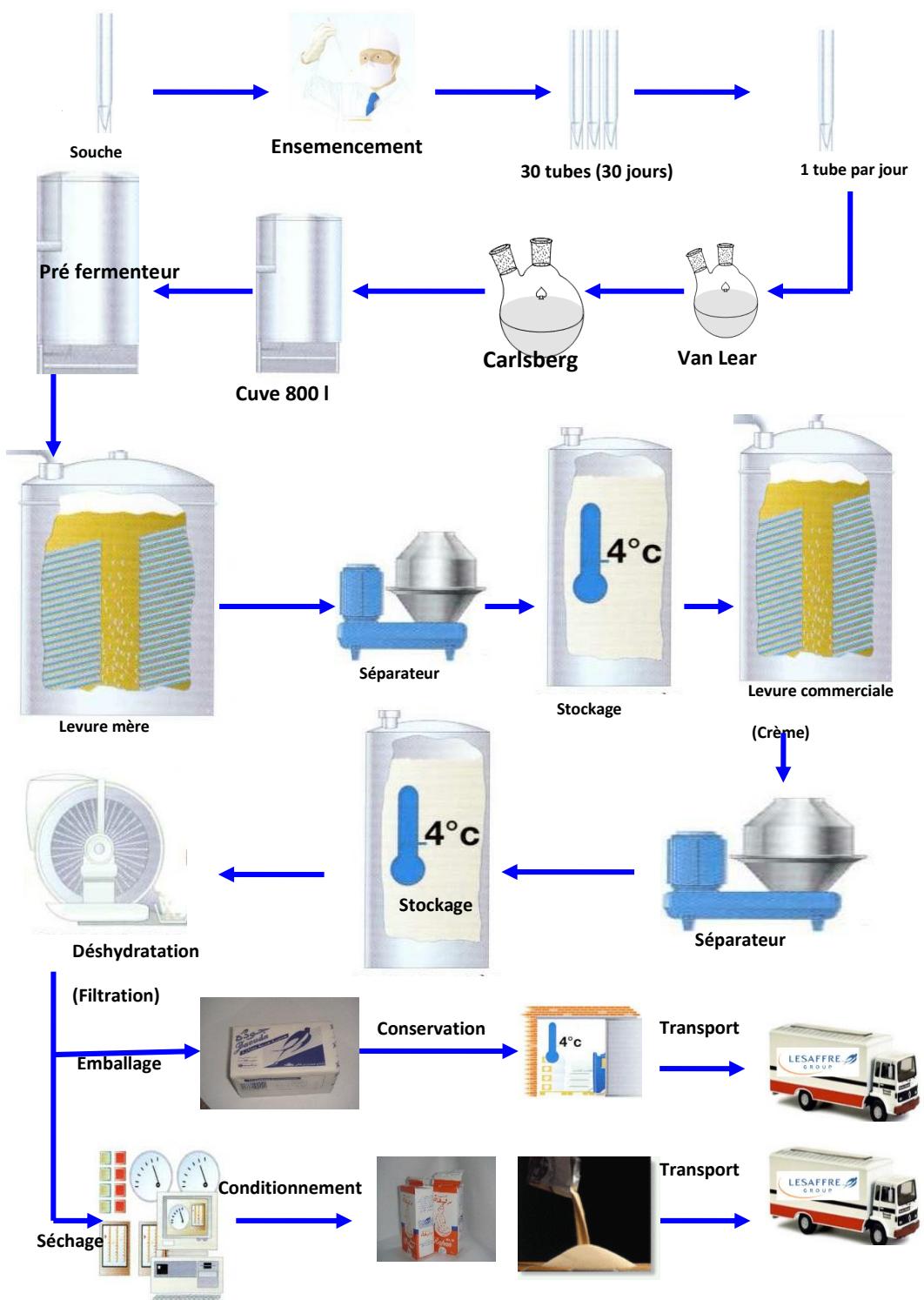


Figure 1: Schéma général des étapes de production de la levure de boulangerie

# Partie I : Etude bibliographique

## **Partie I : Etude bibliographique**

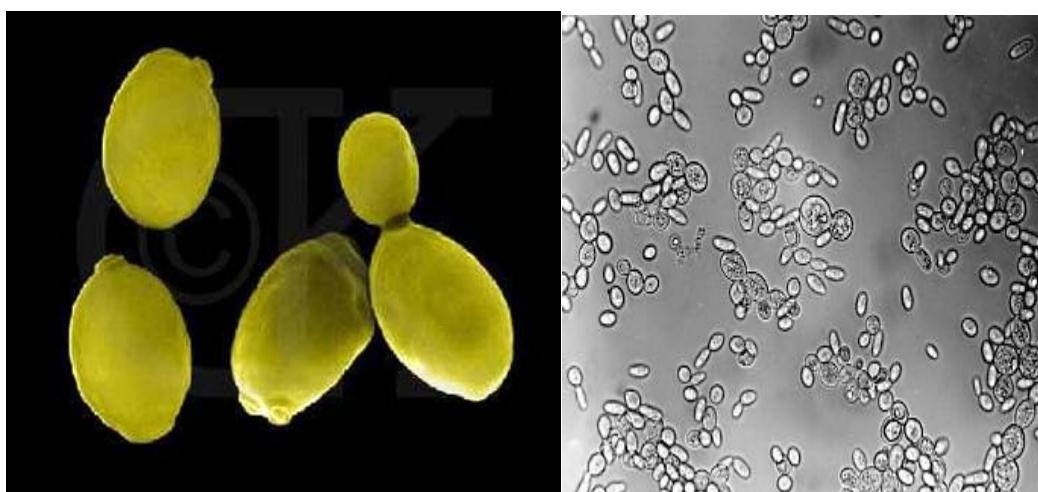
### **I- étude fondamentale des levures**

#### **I-1- Morphologie des levures (Figure 2)**

Les levures sont classiquement définies comme étant des champignons unicellulaires immobiles. Sur milieux gélosés elles forment habituellement des colonies à surface luisante.

Les levures sont regroupées en deux grandes classes selon leur capacité ou non d'élaborer des organes de reproduction sexuée. Les ascomycètes également appelés « levures vraies » ou encore levures ascosporogènes, forment dans certaines conditions des ascospores à l'intérieur de la cellule. D'autres levures sont capables d'élaborer des spores externes apparentées aux basidiospores, ces levures appartiennent au groupe des basidiomycètes. Les levures « fausses » sont classées dans le groupe (supragénique) des deutéromycètes. Elles sont incapables de former, dans des conditions habituelles de laboratoire des ascospores à l'intérieur de la cellule ou des basidiospores (externe). Ces cellules eucaryotes possèdent, en plus d'un noyau entouré d'une membrane nucléaire et comportant jusqu'à 17 paires de chromosomes chez les souches haploïdes de *Saccharomyces*, des organites cellulaires telles que mitochondries, microcorpuscules, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi. Les levures puisent leur énergie par dégradation des substances organiques variées, ce sont des organismes chimiohétérotrophes.

La levure possède le plus simple forme des appareils végétatifs. Il se présente sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir : sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculée, en bouteille, pyramidale.[1]



*Figure 1: Saccharomyces cerevisiae [29]*

#### **I-2- *Saccharomyces cerevisiae***

Les levures et en particulier *S. cerevisiae*, sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée. Ceci tient à leur

importance industrielle, mais aussi à la simplicité de leur organisation unicellulaire et à leur croissance rapide dans les conditions contrôlées du laboratoire, qui en font un modèle expérimental particulièrement commode. Leur étude systématique remonte à la découverte par pasteur de leur rôle dans la fermentation alcoolique, puis aux travaux de buchner sur l'enzymologie de la fermentation. [1]

*Tableau 1: Caractéristiques biochimiques de *Saccharomyces cerevisiae* [1]*

Sucres fermentés					
Glucose	+		Maltose		+
Galactose	V		Lactose		-
Saccharose	V				
Assimilation des composés carbonés					
Galactose	V	Raffinose	V	Erythritol	-
Saccharose	V	Amidon soluble	V	Ribitol	-
Maltose	V	D-xylose	-	D-mannitol	V
Cellulose	-	L-arabinose	-	Ac. succinique	-
Tréhalose	V	D-ribose	-	Ac. citrique	-
Lactose	-	L-rhamnose	-	Inositol	-

### I-3- Multiplication *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* est capable de se multiplier sous deux formes : une forme diploïde ( $2n = 32$  chromosomes) et une forme haploïde ( $1n = 16$  chromosomes). Les cellules haploïdes se multiplient en bourgeonnant.

- **Multiplication asexuée ou végétative (bourgeonnement)**

Le cycle cellulaire d'une levure correspond à la croissance de la cellule suivie de sa multiplication.

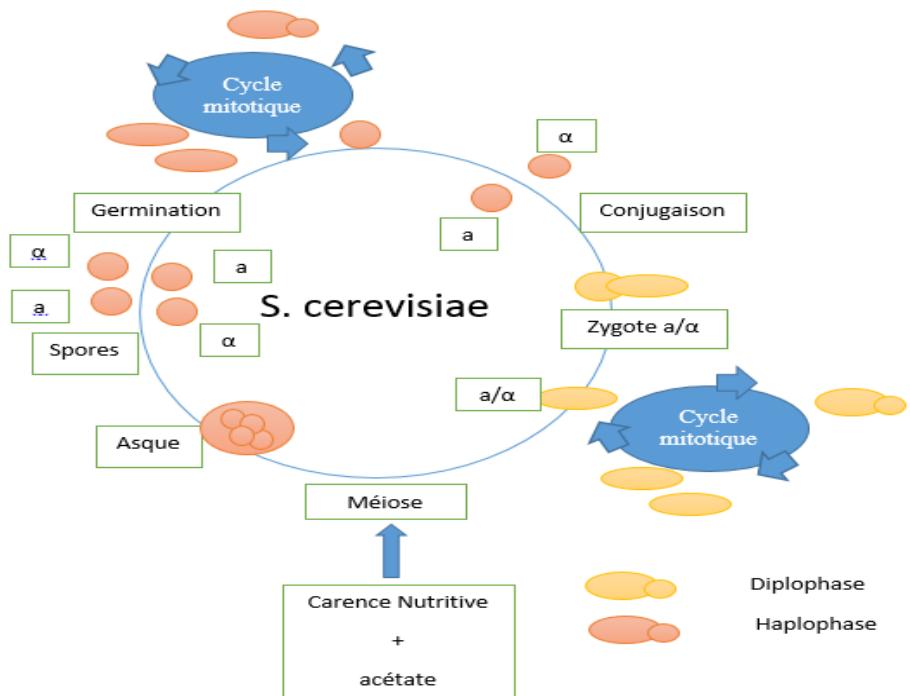


Figure 2: cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae* [1]

Il s'agit d'un processus dynamique qui se divise en quatre phases principales : la phase de synthèse du DNA (phase S), la phase post synthèse (G2) suivie de la mitose (M), puis de la phase G1. Les événements biochimiques et cytologiques qui se déroulent au cours du cycle cellulaire de *S. cerevisiae* ont pu être élucidés puis approfondis à la suite des travaux sur des mutants « cdc » sensibles à la température. À chaque mutant « cdc » correspond un phénotype.

Au cours de la phase de bourgeonnement de *S. cerevisiae* c'est essentiellement le bourgeon qui se développe tandis que le volume de la cellule mère diminue puis augmente à nouveau. En opérant par cinéphotomicrographie, Lord et Wheals (1981) ont observé qu'après séparation, le volume des cellules filles est toujours plus petit que celui des cellules mères. Suivant les substrats nutritifs utilisés, le temps de génération est plus ou moins long, mais il est toujours plus long pour les cellules filles. Plus le temps de génération est allongé, plus la taille des levures filles à leur naissance est petite.[1]

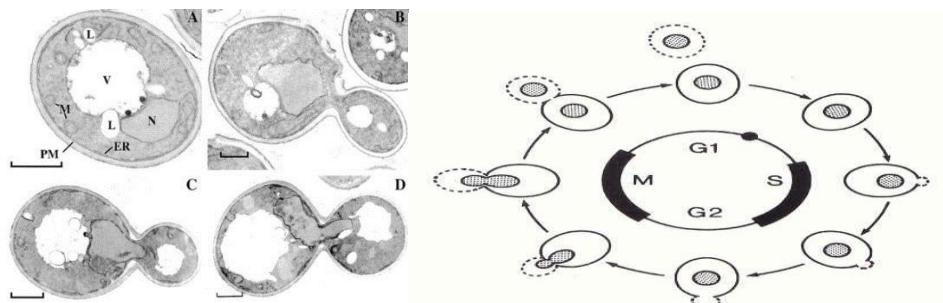
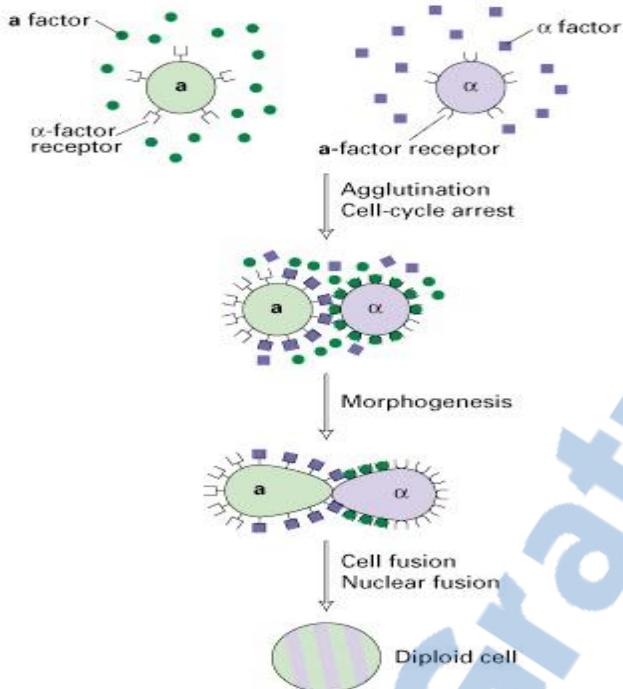


Figure 3:bourgeonnement *Saccharomyces cerevisiae*

- **Multiplication sexuée**



*Figure 4: La conjugaison de deux cellules haploïdes*

Les cellules haploïdes émettent des phéromones (facteurs a ou  $\alpha$ ) détectées par les cellules de type sexuel opposé grâce à des récepteurs spécifiques. La fusion cellulaire et nucléaire des deux cellules haploïdes aboutit à la formation d'une cellule diploïde. Les phéromones induisent un arrêt du cycle cellulaire et des transcriptions spécifiques

#### I-4- Procédés aérobies de production des levures

Il existe différents procédés industriels de production de levures : les levures de boulangerie, les levures aliments, les fermentations. Les levures sont aussi utilisées pour la production d'enzymes, de protéines diverses et de vaccins après recombinaisons génétiques.

La croissance aérobique de *Saccharomyces cerevisiae* met en jeu différentes voies métaboliques selon la nature et la concentration de la source de carbone dans le milieu. Cela se traduit par des variations importantes des vitesses et des rendements de croissance, ou même par l'excrétion de métabolites. Sur glucose existent deux types de métabolisme selon la concentration de la source de carbone dans le milieu : un métabolisme respiratoire pour de très faible concentration (généralement en dessous de 100mg/l en glucose) [1]



$$Y = \frac{1gO_2}{gX}$$

- Rendement massique

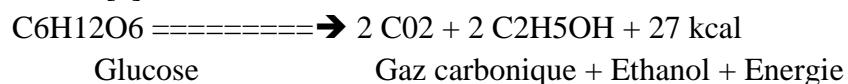


Rdt en biomasse /substrat = 40%

et un métabolisme fermentaire avec une excrétion d'éthanol à des concentrations plus élevées. Après puisement de glucose, la levure peut aussi avoir un métabolisme respiratoire sur l'éthanol. A cause de ces différents états métaboliques, les cinétiques sont très différentes en fermentations discontinues et continues.[1]

### I-5- Procédé de Fermentation anaérobiose de levure

En l'absence d'air, la levure fermente : grâce à ses enzymes (les zymases), elle dégrade les sucres simples (en C6) présents dans son milieu de vie, par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation de 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.[8]



### 1-6 La fermentation en semi-continu et les Paramètres à contrôler

Le mode de culture industriellement le plus utilisé pour la production de levures est le semi- continu. La source de carbone et d'autres nutriments sont ajoutés en continu sans soutirer de milieu. Le volume de milieu dans le fermenteur augmente donc durant le procédé.

Ce mode de culture est bien adapté à la production de levures parce qu'il permet de se maintenir à une faible concentration en glucose et évite ainsi une production important d'éthanol.

Le contrôle et le suivi en ligne des paramètres de la production de biomasse de levures pour la panification, peut permettre d'améliorer le rendement et la qualité de la production. Le contrôle d'une production de levain nécessite une bonne connaissance de la cinétique du procédé : vitesse de croissance, consommation de sucres, production de CO<sub>2</sub> et d'éthanol. Ainsi que d'autres paramètres à contrôlé :

- ✓ Le sucre, sous sa forme mélasse, représente le substrat le plus utilisé et le plus adapté à la production de biomasse ou de levures et sa concentration.
- ✓ Mesure de conductivité
- ✓ Mesure d'oxygène dissous, OTR, OUR et vitesse Injection d'air dans le milieu de culture.
- ✓ Paramètres régulés: Température, Agitation, Anti-mousse et pH.
- ✓ Concentration levure et concentration en éthanol.

### • Débit d'alimentation[15]

En faisant le bilan en biomasse et en substrat de bioréacteur, on démontre que le débit de la mélasse répond à la dormule suivant :

$$Q = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{(S_a - S) Y_{X/S}}$$

Sa : est la concentration en sucre dans l'alimentation.

S : la concentration en glucose dans le bioréacteur.

$Y_{X/S}$  : Rendement de conversion de glucose en levure.

Q : le débit d'alimentation.

X : concentration de la levure.

$\mu$  : vitesse spécifique de croissance.

$V_0$  : le volume de milieu dans le fermenteur à  $t_0$ .

### • Paramètres d'aération de fermenteur [15]

La performance maximale d'un procédé de production de levure est souvent déterminée par la capacité maximale de transfert d'oxygène du système d'aération.

#### 1- Les vitesses de consommation d'oxygène

L'oxygène dissous doit être considéré comme un substrat pour les microorganismes.

Une loi de type monod généralisée est utilisé pour représenter des limitations à la fois par la source de carbone et par l'oxygène dissous, ainsi la vitesse spécifique de croissance  $\mu$ .

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{G_1}{K_{G_1} + G_1} \right) \left( \frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \right)$$

G<sub>1</sub> et O<sub>2</sub> étant les concentrations en glucose et en oxygène dans le milieu  $K_{G_1}$  et  $K_{O_2}$  leurs constantes de seuil.

Le taux de consommation d'oxygène est notée OUR (oxygen uptake rate)

$$OUR = q_{O_2} = \frac{\mu_g X}{Y_{X/O_2}}$$

$q_{O_2}$  : Taux spécifique de consommation d'oxygène (mg O<sub>2</sub> / g de cells .h)

$Y_{X/O_2}$  : coefficient de rendement de l'oxygène (g de cells / g O<sub>2</sub>)

X : la concentration des cellules (g de cells /l)

## 2- La vitesse de transfert d'oxygène

La capacité de transfert de l'oxygène d'un système d'aération est caractérisée par un coefficient de transfert  $K_L a$ . La vitesse de transfert par unité de volume de milieu est alors donnée par l'équation suivante :  $r_{O_2} = K_L a(O_2^* - O_2) = OTR$

O<sub>2</sub>\* est la solubilité de l'oxygène ou la concentration maximale d'oxygène dissous en équilibre avec la phase gazeuse.

O<sub>2</sub> la concentration réelle d'oxygène dans le milieu.

$K_L a$  Coefficient globale de transfère d'oxygène. exprimé en mmoles d'O<sub>2</sub>/L.h.atm

## 3- Les limitations par l'aération de la concentration cellulaire

La relation de base de l'aération est l'égalité entre les vitesses de transfert et de consommation de l'oxygène  $K_L a(O_2^* - O_2) = Q_{O_2} X$

La concentration d'oxygène ne doit pas descendre en dessous d'une valeur critique  $O_{2crit}$  pour éviter des limitations de croissance par oxygène. la vitesse maximale de transfert d'oxygène est égale à  $K_L a(O^{2*} - O_{2crit})$ , ce qui représente une concentration maximale Xmax .

$$Xmax = \frac{K_L a(O^{2*} - O_{2crit})}{Q_{O_2}}$$

# II- Les levures : leurs utilisations en alimentation humain et dans l'industrie agro-alimentaires.

## II-1- levure et l'industrie agro-alimentaires

Quel que soit son espèce ou le substrat sur lequel elle s'est développée, la levure-aliment est ainsi définie par la C.C.E : « la levure-aliment est une levure tuée, privée de pouvoirs fermentaires, séchée, n'ayant subi ni extraction, ni ajout ». [1]

Quelque soit le substrat envisagé, la production de levures comprendra les travaux préalables suivants :

- Etude des souches de levures fermentant le composé carboné.
- Analyse de la composition du liquide à fermenter et essais sur fermenteur pilote pour établir la formule des sels nutritifs complémentaires et des oligoéléments à apporter pour assurer une production optimale des levures.

## **II-2- Paramètres influençant l'activité levuriennes [8]**

### **• L'hydratation**

L'eau facilite l'activité de la levure en améliorant la mobilité des cellules de levure, en dissolvant les constituants fermentescibles et en assurant le contact entre les enzymes et le substrat.

La baisse d'hydratation opérée pour maintenir le niveau de consistance lorsqu'on incorpore certains ingrédients comme la matière grasse ou le sucre, diminue l'activité levuriennes ( $\Rightarrow$  on augmente l'apport de levure pour compenser cette diminution d'activité).

### **• Le pH**

La plage optimale de pH pour l'activité levuriennes se situe entre 4,6 et 6. Dans les pâtes ensemencées à la levure, le pH varie de 5,2 à 5,7.

### **• La température**

L'augmentation de la température, jusque 40°C cependant, accélère la fermentation des sucres par la levure. A partir de 50°C (début de la cuisson du pain), l'inactivation des levures commence. En boulangerie française, on considère que la température optimale de fermentation se situe aux environs de 27°C, permettant un compromis entre la vitesse de fermentation (production de gaz) et la qualité technologique des pâtes (texture).

Aux températures basses, proches de 0°C, l'activité est quasiment nulle. La levure se conserve en congélation, à condition que la congélation soit rapide (Surgélation). Une partie des levures congelées dans un produit de panification est cependant détruite en congélation (déshydratation létale des cellules par osmose : la concentration (donc la pression osmotique) du milieu hydrate cristallise (gelé) augmente et l'eau migre de l'intérieur de la cellule à l'extérieur) notamment les levures en phase de bourgeonnement (reproduction asexuée)  $\Rightarrow$  on augmente les doses de levure dans les pâtes destinées à être congelées pour compenser cette létalité.

### **• La pression osmotique et la force ionique**

Le sel et les sucres augmentent la pression osmotique et modifient (diminuent) de ce fait l'activité levuriennes. Cette augmentation de la pression osmotique conduit à

la diffusion de l'eau intracellulaire vers l'extérieur de la cellule, donc à une déshydratation.

Les sucres cependant, à des doses inférieures à 10%, active la fermentation. D'autre part, la dissociation du sel dans l'eau (sous forme ionique Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>), contribue à diminuer les activités enzymatiques, donc le fonctionnement de la levure.

### • La concentration en alcool

L'augmentation de la concentration en alcool au cours de la fermentation autofreine progressivement l'activité levurienne.

## III- Le rôle de la levure dans la fabrication du pain

La levure assure la production de gaz carbonique au sein de la pâte au cours d'un processus de fermentation. Ce gaz s'accumule dans des alvéoles qui s'épanouissent dans la mie au cours de la cuisson. En plus de ces composés majoritaires, éthanol et gaz carbonique, des alcools supérieurs, des aldéhydes, des esters, des acides... sont formés en plus petites quantités et participent qualitativement de façon importante et complexe à la formation des saveurs et de la saveur du pain.

La production d'énergie au cours de la fermentation augmente de manière significative la température des pâtes (entre 2 et 3°C).

Lors de la fermentation panaire, on considère que le milieu est principalement anaérobie. Mais au cours du pétrissage, l'apport d'air et la présence d'oxygène dissous dans l'eau permettent à la levure de fonctionner en aérobiose (respiration). La multiplication cellulaire des levures augmente avec l'hydratation des pâtes. Le facteur de multiplication est lié à une concentration optimale en levures (il est plus faible lorsque la concentration en levures augmente, en raison de phénomènes de concurrence dans l'utilisation de l'oxygène et des sucres fermentescibles).

Deux catégories de sucres sont disponibles : les sucres directement fermentescibles contenus dans la farine ou apportés par la formulation et les sucres issus de l'hydrolyse de l'amidon (amyloses) :

- glucose et fructose sont fermentés très rapidement
- le saccharose (sucre de la betterave) est hydrolysé en glucose et fructose grâce à l'invertase de la levure.
- Le maltose issu de l'amylose de l'amidon par les α- et β-amylases de la farine (ou apportées par la formulation) pénètre dans la levure grâce à la maltopermease de la levure et est hydrolysé par la maltase de la levure, en glucose.

En fermentation anaérobie 95% des sucres consommés par la levure sont transformés en CO<sub>2</sub> et éthanol, le reste est engagé dans des processus de fermentations secondaires précurseurs des principaux composés volatils aromatiques (glucose → acide pyruvique → éthanol, acides organiques comme l'ac. lactique ou encore l'ac. acétique, esters et composés carboxyles).[8]

## **IV- population contaminants altérant la qualité sanitaire et marchande**

Les contrôles microbiologiques au cours d'une production industrielle peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluer la qualité microbiologique ;
- maîtriser la qualité et la pureté ;
- évaluer le niveau de contamination.[2]

Au cours de fabrication pourront se développer des levures sauvages ou des bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Rarobacter* et qui sont capable d'entrainer la lyse de la levure. La levure peut également contenir des contaminants classiques (coliformes, parfois bactérie lactique) ainsi que par des germes plus spécifiques qui sont les « bacilles du pain filant » (*Bacillus subtilis* et *B. licheniformis*).[3]

### **IV-1- Flore totale aérobiose mésophile**

Il s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissance comprises entre +20°C et +45°C.

Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération varie.

Ainsi, en microbiologie alimentaire, on recherche et dénombrement les microorganismes aptes à cultiver en 72 heures à 30°C et en gélose pour dénombrement. Dans ce cas, la flore exigeante n'est pas détectée.

#### **Indice de qualité sanitaire :**

En général il n'y a de risque pour la santé du consommateur que si la flore totale mésophile aérobiose est supérieure ou égale à  $10^5$  microorganismes/g.

#### **Indicateur de la qualité marchande**

La flore totale peut être considérée comme flore d'altération car la présence d'une flore mésophile aérobiose revivifiable abondante indique un processus de dégradation en cours. En principe, une flore aérobiose mésophile dépassant  $10^6$  à  $10^8$  microorganismes par gramme provoque une détérioration visible du produit. [2]

### **IV-2- Coliformes totaux**

Selon la norme ISO 4831 JUILLET 1991, le terme coliforme correspond à « des organismes en bâtonnets, non sporogènes, à coloration de Gram négative, oxydase négative, aérobies ou facultativement anaérobies, capable de croître en présence de sels

biliaire ou d'autre agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose avec production du gaz en 48h ... » [2]

### **IV-3- Levures sauvages**

Les levures sont les plus petits êtres vivants présents dans les fruits mûrs mais aussi dans l'air. On les désigne par l'expression «levures sauvages». Mais l'industrie agroalimentaire utilise des types de levure spécialement élevés, des «levures pures» ou «levures de culture».

### **IV-4- Moisissures**

Les moisissures sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. Ils sont multicellulaires mais la notion de cellule est assez floue car leur structure est généralement cénocytique.[3]

Elles ne représentent pas un groupe botanique bien défini. Selon littré, elles sont « l'altération de la chose moisie ».

Nous les définirons comme l'ensemble des champignons saprophytes une végétation notable et qui ont de l'importance dans l'industrie humaine.

Elles peuvent être :

- Nuisible, cas agent d'altération d'aliments ;
- Utiles, cas intervenant dans la production d'aliments.[9]

### **IV-5-Les normes de levure de boulangerie**

On peut indiquer les normes de contaminants suivantes :

- Levures « sauvages » < 1% ;
- Flore aérobie mésophile <  $10^6$ /g ;
- Coliformes <  $10^2$ /g ;
- Bactéries sporulées aérobies type « pain filant » ou « lyse » <  $10^2$ /g ;
- Absence de germes pathogènes. [3]

## **V- Méthodes de quantification des populations contaminants**

Le principe de ces méthodes s'appuie sur le fait qu'un microorganisme présent dans un aliment ou dans une suspension de ce produit, mis en culture, dans les conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie ou une microcolonie. Il s'agit de faire correspondre un microorganisme à une UFC.

## **V-1- Méthode standard : culture dans la masse d'en milieu gélosé**

### **Méthode : plate count agar (PCA)[2]**

Les étapes de cette méthode sont les suivantes :

- Inoculation de 1 ml de suspension ou de ses dilutions dans le fond d'une boîte de petri. Chaque essai est testé deux fois au minimum ;
- Homogénéisation dans V ml de milieu de culture approprié et maintenu en surfusion ;
- Incubation à t °C pendant x h ;
- Dénombrement des colonies.

## **V-2- Dénombrement après cultures**

Il s'agit de mettre en culture sur un milieu solide approprié le produit pour lequel on souhaite réaliser un dénombrement, le développement des microorganismes dans un milieu de culture solide donne naissance à des colonies. Une colonie peut être issue d'un ou de plusieurs microorganismes formant un amas. Les colonies sont dénombrées et le résultat est exprimé en nombre d'UFC (unité formant colonie) par mL de suspension de départ.

Soit n1 et n2 colonies dénombrées sur une surface correspondant à V ml.

Alors N (nombre de microorganismes par ml d'échantillon) s'exprime par :

$$N = \frac{(n_1 + n_2)}{V}$$

[2]

## **V-3- Choix des conditions d'incubation**

Le but est d'obtenir un résultat, c'est-à-dire un développement des microorganismes présent dans des délais relativement brefs, donc d'assurer des conditions de développement optimal ou des conditions sélectives. [3]

### **V-3-1- température d'incubation**

Les températures sont fixées par des normes établies (exemple : NFV 08019 De décembre 1985ISO 7937) pour chaque dénombrement :

- Flore mésophile aérobie : 30 °C +/- 1°C ;
- Coliformes : 30°C +/- 1°C ;

- Moisissure 30°C +/- 1°C ;
- Levure sauvage 30°C +/- 1°C.

### **V-3-2- durée d'incubation**

Elle varie en fonction du germe et de la technique utilisée pour le dénombrement.

Une lecture après 24 heures permet un résultat des coliformes ;

Certains dénombrement nécessitent une lecture à 3 puis 5 jours : levures et moisissures ;

D'autre dénombrement se lit, après une incubation de 72h : Flore mésophile aérobie.

### **V-4- Observations microscopiques**

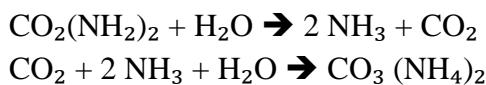
L'observation microscopique se fait à l'état frais. Les bactéries sont vivantes, on peut alors déterminer des caractères tels que la morphologie générale, la mobilité et le groupement ainsi que le type de colonies.

## **VI-Les sels nutritifs**

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.

### **1- L'azote**

La levure possédant une uréase très active transformant l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium.



Cette réaction se traduit par une alcalinisation du milieu.[3]

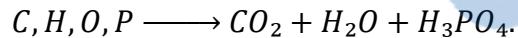
L'azote est généralement fourni et assimilé sous forme d'ions  $\text{NH}_4^+$ (ammonium). Pour leur intégration avec les acides aminés. [9]

Au niveau enzymatique, l'action des ions ammonium peut s'exercer au niveau du métabolisme primaire ou de la formation des enzymes du métabolisme secondaire. La source azotée a aussi une influence sur le pH. L'addition répétée d'ions ammonium au cours d'une fermentation en bioréacteur permet non seulement un contrôle de l'apport azoté mais aussi le maintien du pH. [10]

## **2- phosphate**

La croissance des microorganismes réclame des concentrations en phosphate variant entre 0.3 et 300 g/100 ml.

L'étude quantitative du phosphore présent dans un composé organique se fait habituellement par oxydation en ions orthophosphate que l'on étudie ensuite par calorimétrie. [4]



La réalisation d'une réduction entre le phosphate et le molybdate, forme un corps chimique dont la coloration bleue qui adsorbe dans l'UV visible à une longueur d'onde de 660 nm. Cette absorbance est proportionnelle au taux de  $P_2O_5$ .

## **VII- Management de la sécurité**

Le codex alimentarius a défini un document qui suit la chaîne alimentaire depuis la production primaire jusqu'au consommateur final, en définissant les conditions d'hygiène nécessaires à la production d'aliments sûrs à la consommation. Ces codes et directives spécifiques doivent être considérés conjointement aux principes généraux ainsi qu'avec le système HACCP. [7]

HACCP est l'acronyme bien connu de *Hazard Analysis Critical Control Point*. En français, il s'agit d'un système d'analyse des dangers et de point critiques pour leur maîtrise. Cette méthode est devenue, au plan mondial, synonyme de la sécurité des aliments. A l'origine, le concept du HACCP a été développé comme un système de sécurité microbiologique au début du programme spatial américain, dans les années 60, pour garantir la sécurité des aliments pour les astronautes. Le système d'origine a été conçu par Pillsbury Company, en coopération avec la National Aeronautic and Space Administration (NASA) aux Etats-Unis et les laboratoires de l'armée américaine. [7]

### **VII-1- Plan HACCP**

Chaque établissement doit mener une évaluation du risque complète pour tous ses procédés et produits. Grâce à cette évaluation, l'établissement peut recenser et maîtriser efficacement tous les dangers présents en ses murs.

Un plan HACCP est un document écrit conçu conformément aux étapes ci-dessous afin d'assurer la maîtrise des dangers associés à la salubrité des aliments dans un établissement.

L'élaboration de chaque plan HACCP comprend douze étapes, que voici :

1. Constitution de l'équipe HACCP ;
2. Description du produit et de l'utilisation prévue ;

3. Énumération des ingrédients et des matériaux reçus de l'extérieur ;
4. Réalisation d'un diagramme de production et confirmation de son exactitude ;
5. Réalisation d'un schéma des opérations et confirmation de son exactitude ;
6. Recensement et analyse des dangers (principe 1) ;
7. Détermination des points critiques à maîtriser (CCP) et des autres mesures de contrôle, c.-à-d. les mesures de contrôle du processus (CP) et les programmes préalables (PP) (principe 2) ;
8. Détermination des limites critiques pour les CCP (principe 3) ;
9. Détermination des procédures de surveillance des CCP (principe 4) ;
10. Détermination des procédures de rectification pour les CCP (principe 5) ;
11. Détermination des procédures de vérification pour les CCP (principe 6) ;
12. Détermination des procédures de tenue de dossiers concernant les CCP (principe 7).

Les étapes 1 à 5 sont des étapes préliminaires à l'analyse des dangers. Les étapes 6 à 12 intègrent les sept principes HACCP élaborés par la Commission du Codex Alimentarius.

# Partie II : Partie pratique

## **Partie II : Etudes pratiques**

L'objectif de notre travail est de faire un suivi physico-chimique et microbiologique des sels et de vérifier les principes de PP et HACCP pour la revalidation du HACCP dans les circuits des sels nutritifs de sa réception à la fermentation au sein de la société LESAFFRE Maroc.

### **I- Les sels nutritifs**

#### **I-1- L'urée**

L'urée est fabriquée en faisant agir l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) avec  $\text{CO}_2$  sous pression.

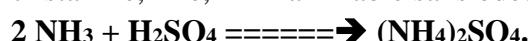


Puisque l'azote est combiné avec le carbone, l'urée est une source organique d'azote, qui se présente sous forme des granules sphériques blancs, fin, ininflammable, sans odeur.

- Poids moléculaire : 60,05539g/mol
- Formule :  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$
- Contient : 46%  $\text{N}_2$
- L'urée contient 46% la teneur la plus élevée en azote de tous les engrains solides communs, ainsi il est moins hygroscopique et moins corrosive.
- Conditionnement : sac de 50kg

#### **I-2- sulfate d'ammonium**

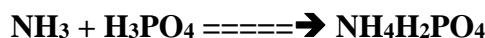
Le sulfate d'ammonium est un sel très pur. Il résulte de la réaction entre l'ammoniac et l'acide sulfurique, qui se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline, fine, ininflammable sans odeur.



- Poids moléculaire : 132,1g/mol
- Formule :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Contient 21%  $\text{N}_2$
- Le sulfate d'ammonium est utilisé pour sa teneur en azote ammoniacal. Ce composé est indispensable à la biosynthèse des protéines pariétales indispensables au transfert des sucres de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Privés d'azote, les levures ne peuvent pas se multiplier.

#### **I-3- Monoammonium phosphate**

Produit de la réaction d'une molécule d'ammoniac avec une molécule d'acide phosphorique



- Poids moléculaire : 132g/mol
- Formule :  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
- Contient : 12% de N<sub>2</sub> et 63% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>
- Le MAP est utilisé pour sa teneur élevée en phosphore.

#### I-4- Les étapes du traitement des sels nutritifs

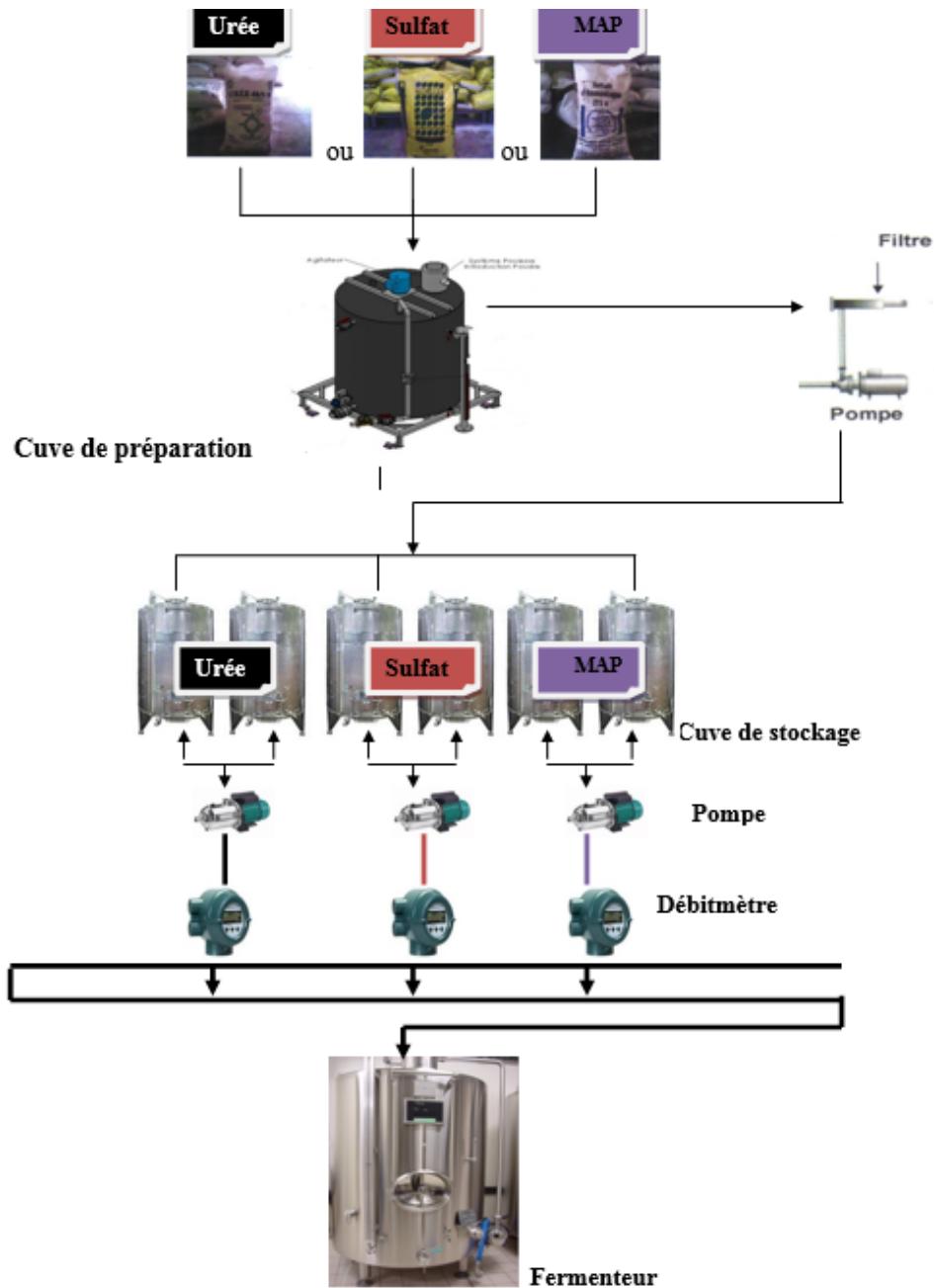


Figure 5:schéma du circuit de préparation des sels nutritif

#### ❖ Réception et Stockage

Les sels, proviennent de différents fournisseurs du Maroc par des camions, sont suivis un contrôle du teneur en azote et phosphore pour le monoammonium phosphate,

et l'azote pour l'urée et sulfate d'ammonium, pour s'assurer qu'ils répondent aux exigences du cahier de charge.

Après on stock les sels dans un dépôt à l'abri de la lumière et exempt d'odeur.

### ❖ Dilution

Afin d'obtenir des concentrations des sels souhaitées, différentes dilutions sont réalisées.

Les sels bruts se mélangent avec l'eau dans des bacs ayant des volumes différents :

- ❖ Pour l'urée on met 45 sacs de 50 kg dans un volume d'eau de 10000L.
- ❖ Pour le sulfate d'ammonium on met 25 sacs de 50 kg dans un volume d'eau de 6000L.
- ❖ Pour le Monoammonium phosphate, on met 50 sacs de 25 kg dans un volume d'eau de 10800L.

### ❖ Chloration

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

On effectue la chloration au moment de la préparation des sels nutritifs par l'ajout d'un volume d'eau de javel afin d'éviter toute contamination des solutions.

### ❖ Filtration

Avant le transfert au bac de stockage, la solution diluée traverse un filtre qui contient des pores très fins afin d'éliminer les impuretés.

### ❖ Refoulement :

Le refoulement de la solution diluée s'effectue par les pompes centrifuges.

### ❖ Stockage des sels dilués

Après l'élimination de la partie sursaturation, on transfert la partie soluble au bac de stockage.

## **II- Matériel et méthode**

### **II- 1- les analyses physico-chimiques**

Au cours de différentes étapes de contrôles des sels nutritifs au sein de la société LESAFFRE Maroc, quelques paramètres physico-chimiques font l'objet d'une analyse tels que :

- l'azote ;
- le phosphate  $P_2O_5$  ;
- pH et conductivité.

#### **II-1-1- Dosage d'azote**

La principale méthode utilisée pour le dosage de l'azote est fondée sur le procédé de Kjeldahl.

Dans la méthode de Kjeldahl, l'azote organique est transformé en hydrogénosulfate d'ammonium par action d'acide sulfurique concentré, et on mesure la quantité d'ammoniac libérée par le sel d'ammonium. [4]

##### **❖ la méthode de Kjeldhal**

###### **✓ Principe :**

L'azote organique est transformé en azote minéral, sous forme ammoniacale  $(NH_4)_2SO_4$ , par action oxydante de l'acide sulfurique  $H_2SO_4$  à 98% et à chaud en présence d'un catalyseur.

L'ammoniaque formé est déplacée par une base forte  $NaOH$  à 30% en excès et entraîné par distillation dans l'acide borique  $H_3BO_3$  à 2% en excès à fin de piéger l'ammoniac.

Le borate d'ammonium formé est dosé par  $H_2SO_4$  à 0.05 N.

###### **✓ Minéralisation :**

- Prélever 20ml de chaque solution et mettre dans les matras
- Ajouter 5ml de  $H_2SO_4$  concentré à 98% à l'aide d'une dispensent;
- Ajouter  $\frac{1}{2}$  comprimé du catalyseur de Kjeldhal ;
- Poser les tubes d'évacuation avec les joints sur les tubes de digestion et les livrer par des pinces.



*Figure 6:l'appareil de minéralisation*

### ✓ Distillation et titration:

Après minéralisation (1heure) et refroidissement, ajuster à 100 ml une fiole jauge avec eau distillée ;

- Prélever 50ml de cette solution et mettre dans les matras,
- Placer le tube dans le distillateur ;
- Ajouter 20ml de la soude à 30% dans le matras et 20 ml de l'acide borique à 2% dans le bêcher de BUCHI;
- Régler le temps de distillation à 4min ;
- Démarrer la distillation ;



*Figure 7:l'appareil de distillation*

Déplacement par la soude en excès :

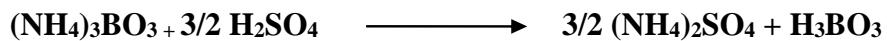


Entrainement par distillation dans l'acide borique en excès



### ✓ Titrage en retour :

Titrer le distillat récupéré avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05N à l'aide d'un titreur automatique tout en introduisant l'électrode du pH-mètre (pour lire le pH) dans le bécher tout en agitant par agitateur magnétique



### ✓ Calcul :

$$\% \text{ azote total} = V.T (H_2SO_4) * 0,07 / P.E$$

V.T= volume de titration en ml.

P.E = Prise d'essai en g.

## II-1-2- Dosage de taux du phosphore

### ✓ Préparation

Prélever 20ml de la solution obtenue après dilution, et l'introduire dans une fiole de 50ml, puis on ajoute:

- 4ml de METOL à 2%.
- 4ml d'héptamolibdate d'ammonium.
- 2ml de bisulfite de sodium à 35%.

Et on complète au trait de jauge par l'eau distillée.

On obtient un complexe bleu « phosphomolibdate d'ammonium », qu'on va laisser reposer une demi-heure avant la lecture de l'absorbance dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660nm.

### ✓ Calcul :

$$\%P_2O_5 = A * K * 0,5 / P.E$$

## II-1-3- Dosage de pH et conductivité

### ❖ pH

Le pH du mélange est mesuré par un pH-mètre.

Déposer la solution dans un bécher, puis Introduire la sonde de mesure dans le bécher, après Lire le pH-mètre.

### ❖ Conductivité

La conductimétrie est une technique consistant à mesurer la conductance, inverse de la résistance électrique  $R$  d'un certain volume de solution.

Pour effectuer cette mesure, on plonge dans la solution une cellule de conductimétrie.

## **II-2- les analyses microbiologiques**

### **II-2-1- Préparation des milieux (annexe)**

- Gélose nutritive gélosé (GNG) ;
- Désoxycholate lactose agar ;
- Lysine.

### **II-2-2- Analyses effectué**

Les analyses microbiologique effectué sont :

*Tableau 2:les analyses microbiologiques*

Bactérie	Milieu de culture	T° d'incubation	Tps d'incubation
<b>Bactérie totales</b>	GNG :	30°C	72h
<b>Coliformes totaux</b>	Désoxycholate lactose agar	30°C	24h
<b>Levures sauvages</b>	Lysine	30°C	72h
<b>Moisissures</b>	Lysine	30°C	72h

### **II-2-3- Mode opératoire**

#### **Technique d'ensemencement dans la masse : [2]**

- Marquage des boîtes de Petri vides ;
- Homogénéisation des dilutions ;
- A l'aide d'une pipette stérile de 1 ml, transférer aseptiquement, 1 ml du produit sous forme de gouttes dans le fond de chacune des boites Petri ;
- Couler dans la zone d'aseptise 15 ml de milieu maintenu à 47 °C dans chaque boite Petri, cette addition doit avoir lieu au plus tard 15 min après le dépôt des gouttes ;
- Mélanger l'inoculum au milieu, par rotation délicate dans les deux sens ;
- Laisser le milieu prendre en masse ;
- Une fois le milieu solidifié, retourner les boîtes et les incuber dans l'étuve à la température convenable pendant le temps indiqué.
- Lecture et Dénombrement.

### **III-Résultat :**

#### **III-1- Urée**

Nous avons effectué des analyses physico-chimiques et microbiologiques aux différents stades de chaîne de traitement des sels nutritifs : au cours de préparation des sels, au stade de stockage à 4°C et à l'entrée de fermenteur.

##### **• Préparation**

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectués sur la solution de l'urée au stade de préparation sont les suivants :

*Tableau 3: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de préparation*

		Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMA T	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité ( $\mu$ S/cm)
10/02/14	Préparation	PC*	PC	PC	PC	8.89	8.19	170
11/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.50	8.12	172
12/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.10	7.96	169
13/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.20	8.06	168
14/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.20	7.88	171
17/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.70	7.94	169
18/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.60	7.83	165
19/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.40	9.13	168
20/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.60	8.99	170
21/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.80	8.96	172
24/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.30	9.15	172
25/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.70	9.02	170
26/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.50	8.86	169
27/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.30	8.88	168
28/02/14	Préparation	PC	PC	PC	PC	9.50	8.90	169
						min	8,89	7,83
						max	9,80	9,15
						Moyenne	9,42	8,52
						écart-type	0,25	0,52
								1,88

\*PC : pas de contamination

## • Stock

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution de l'urée au stade de stockage sont les suivants :

*Tableau 4: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de stockage*

Les analyses		Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMAT	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
10/02/14	Stock	PC*	PC	PC	PC	8.85	8.19	170
11/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.30	8.15	171
12/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9	7.96	169
13/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.10	8.15	167
14/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.20	7.88	170
17/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.50	7.98	169
18/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.40	7.83	165
19/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.20	9.2	166
20/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.20	8.99	170
21/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.50	8.96	172
24/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.10	9.19	171
25/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.40	9.02	170
26/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.50	8.91	168
27/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.20	8.92	167
28/02/14	Stock	PC	PC	PC	PC	9.40	8.94	168
		min				8,85	7,83	165
		max				9,50	9,20	172
		Moyenne				9,26	8,54	168,87
		écart-type				0,19	0,52	1,99

\*PC : pas de contamination

## • Fermenteur

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution de l'urée au stade de fermenteur sont les suivants :

*Tableau 5: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution d'Urée au stade de fermenteur*

	Les analyses	Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMAT	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
10/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC*	PC	PC	PC	8.80	8.23	169
11/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9	8.18	170
12/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	8.90	7.96	169
13/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9	8.17	166
14/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.10	7.93	168
17/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.30	8	168
18/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.20	7.83	165
19/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.10	9.40	164
20/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.20	8.99	170
21/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.50	8.99	171
24/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.10	9.19	171
25/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.10	9.12	169
26/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.20	8.91	168
27/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.10	8.97	166
28/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	9.40	8.98	167
		min				8,80	7,83	164
		max				9,50	9,40	171
		Moyenne				9,13	8,59	168,07
		écart-type				0,18	0,55	2,12

\*PC : pas de contamination

### **III-2- Mono-ammonium phosphate**

- **Préparation**

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Mono-ammonium phosphate au stade de préparation sont les suivants :

*Tableau 6: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de préparation*

Les analyses	Microbiologiques				Physicochimiques			
	FMAT	Coliforme s totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Préparation</b>	PC*	PC	PC	PC	1,35	6,55	4,13
11/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	7,77	4,28
12/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	7,73	4,88
13/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,38	6,72	4,76
14/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,29	6,80	4,30
17/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	7,77	4,36
18/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,34	6,94	4,26
19/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	6,80	4,66
20/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,29	7,71	4,36
21/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,33	6,92	4,42
24/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	6,82	4,40
25/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,24	6,82	4,36
26/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,40	6,93	4,75
27/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,50	6,55	4,76
28/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	7,77	4,82
					min	1,24	6,55	4,13
					max	1,50	7,77	4,88
					Moyenne	1,33	7,11	4,50
					écart-type	0,06	0,48	23,37

\*PC : pas de contamination

## • Stock

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Mono-ammonium phosphate au stade de stockage sont les suivants :

*Tableau 7: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de stockage*

Les analyses		Microbiologiques				Physicochimiques			
		FMAT	Coliforme s totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Stock</b>	PC*	PC	PC	PC	1,33	6,53	4,17	484
11/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,26	7,74	4,28	561
12/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	7,72	4,91	490
13/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,36	6,70	4,79	490
14/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	6,79	4,34	496
17/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,29	7,76	4,37	553
18/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,33	6,92	4,30	518
19/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,30	6,80	4,66	513
20/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,27	7,70	4,36	494
21/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,31	6,90	4,45	497
24/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	6,80	4,43	489
25/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,23	6,82	4,37	530
26/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,37	6,92	4,77	523
27/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,48	6,53	4,78	523
28/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	1,27	7,74	4,87	507
		min				1,23	6,53	4,17	484
		max				1,48	7,76	4,91	561
		Moyenne				1,31	7,09	4,52	511,20
		écart-type				0,06	0,48	0,25	23,58

\*PC : pas de contamination

## • Fermenteur

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Mono-ammonium phosphate au stade de fermenteur sont les suivants :

*Tableau 8: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de MAP au stade de fermenteur*

	Les analyses	Microbiologiques				Physicochimiques			
		FMAT	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC*	PC	PC	PC	1,30	6,52	4,19	483
11/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,26	7,74	4,28	561
12/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,29	7,72	4,92	490
13/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,35	6,68	4,81	487
14/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	6,78	4,36	495
17/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,29	7,75	4,38	551
18/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,32	6,91	4,31	517
19/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	6,77	4,70	500
20/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,27	7,69	4,37	492
21/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,31	6,90	4,45	497
24/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,28	6,80	4,43	489
25/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,22	6,82	4,39	529
26/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,37	6,92	4,77	523
27/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,45	6,50	4,80	521
28/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	1,22	7,72	4,89	503
						min	6,50	4,19	483
						max	7,75	4,92	561
						Moyenne	7,08	4,57	509,20
						écart-type	0,48	0,255	23,81

\*PC : pas de contamination

### **III-3- Sulfate d'ammonium**

#### **• Préparation**

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Sulfate d'ammonium au stade de préparation sont les suivants :

**Tableau 9: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de sulfate d'ammonium au stade de préparation**

Les analyses		Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMAT	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Préparation</b>	PC*	PC	PC	PC	3,60	6,72	188
11/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,89	6,87	180
12/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,81	6,83	183
13/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,92	6,68	190
14/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,97	6,66	193
17/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,97	6,71	189
18/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,82	6,75	183
19/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	4,00	6,70	185
20/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,70	6,83	179
21/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	4,01	6,79	182
24/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,91	6,72	189
25/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,76	6,69	192
26/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,88	6,71	190
27/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,80	6,67	193
28/02/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,95	6,72	188
03/03/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,70	6,68	189
07/03/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,92	6,68	192
13/03/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,76	6,69	179
14/03/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,88	6,71	188
20/03/14	<b>Préparation</b>	PC	PC	PC	PC	3,76	3,76	184
		min				3,60	6,66	179
		max				4,01	6,87	193
		Moyenne				3,87	6,74	186,93
		écart-type				0,12	0,06	4,62

\*PC : pas de contamination

## • Stock

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Sulfate d'ammonium au stade de stockage sont les suivants :

*Tableau 10: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de sulfate d'ammonium au stade de stockage*

Les analyses		Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMAT	Coliforme s totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Stock</b>	PC*	PC	PC	PC	3,59	6,73	187
11/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,87	6,90	177
12/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,80	6,85	182
13/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,91	6,69	190
14/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,96	6,68	192
17/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,96	6,72	189
18/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,80	6,77	182
19/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	4,00	6,70	185
20/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,70	6,83	179
21/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	4,00	6,80	181
24/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,90	6,73	190
25/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,76	6,69	192
26/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,87	6,75	188
27/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,79	6,69	191
28/02/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,94	6,75	186
03/03/14	<b>Stock</b>	40	PC	PC	PC	3,69	6,68	188
07/03/14	<b>Stock</b>	PC	PC	PC	PC	3,90	6,66	190
13/03/14	<b>Stock</b>	3	PC	PC	PC	3,73	6,69	179
14/03/14	<b>Stock</b>	19	PC	PC	PC	3,84	6,70	186
20/03/14	<b>Stock</b>	PC	pc	pc	pc	3,75	3,76	184
						min	3,59	6,68
						max	4	6,90
						Moyenne	3,86	6,75
						écart-type	0,12	4,86

\*PC : pas de contamination

## • Fermenteur

Les résultats microbiologiques et physicochimiques effectué sur la solution du Sulfate d'ammonium au stade de fermenteur sont les suivants :

*Tableau 11: résultats d'analyses physico-chimiques et microbiologiques de la solution de sulfate d'ammonium au stade de fermenteur*

Les analyses		Microbiologiques				Physicochimiques		
		FMAT	Coliformes totaux	Levures sauvages	Moisissures	Azote g/100ml	pH	Conductivité 10 <sup>2</sup> (µS/cm)
10/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC*	PC	PC	PC	3,59	6,73	187
11/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,87	6,90	177
12/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,80	6,85	182
13/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,90	6,70	188
14/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,96	6,68	192
17/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,96	6,72	189
18/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,80	6,77	182
19/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,99	6,72	181
20/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,69	6,85	176
21/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	4,00	6,80	181
24/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,90	6,73	190
25/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,75	6,72	190
26/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,87	6,75	188
27/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,79	6,69	191
28/02/14	<b>Fermenteur</b>	PC	PC	PC	PC	3,93	6,79	182
03/03/14	<b>Fermenteur</b>	40	PC	PC	PC	3,68	6,68	187
07/03/14	<b>Fermenteur</b>	45	PC	PC	PC	3,90	6,66	190
13/03/14	<b>Fermenteur</b>	3	PC	PC	PC	3,72	6,69	178
14/03/14	<b>Fermenteur</b>	19	PC	PC	PC	3,83	6,70	184
20/03/14	<b>Fermenteur</b>	pc	pc	pc	pc	3,75	6,76	182
		min				3,59	6,68	176
		max				4	6,90	192
		Moyenne				3,85	6,76	184,85
		écart-type				0,12	0,06	6,15

\*PC : pas de contamination

## IV-Interprétation

### IV-1- Urée

Si dissons les histogrammes de la variation de la teneur d'azote, du pH et de conductivité dans la solution d'azote en fonction de stade de préparation des sels nutritifs.

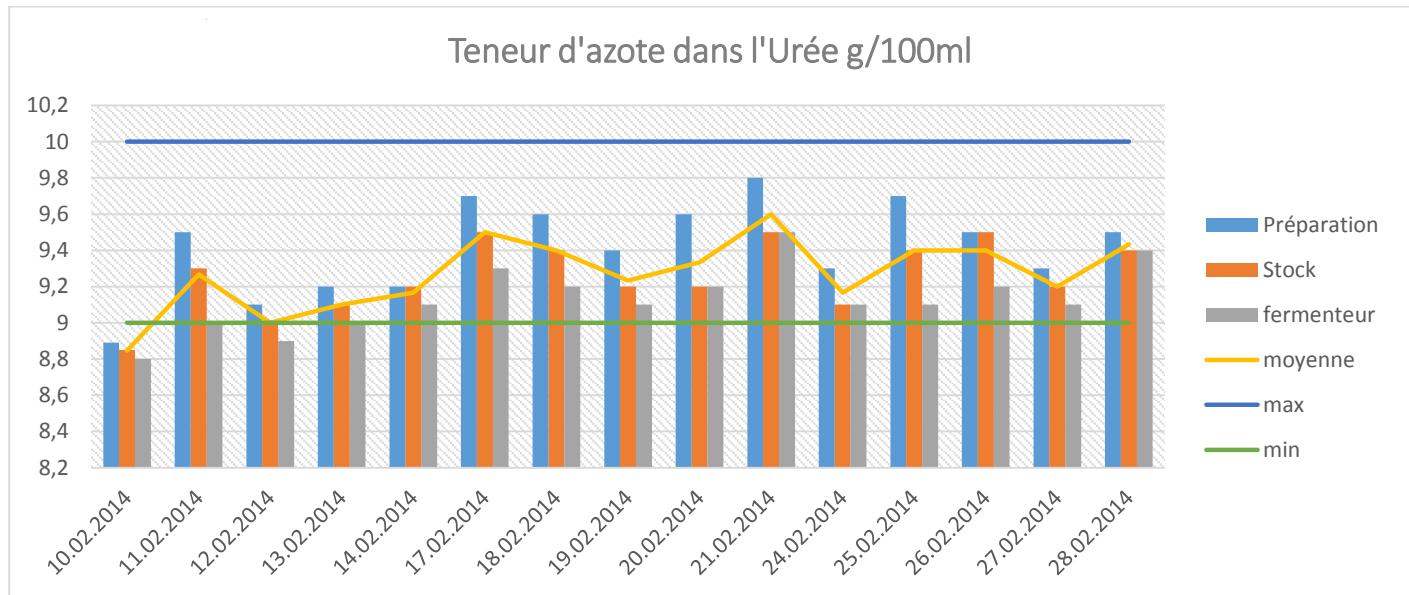


Figure 8: Histogramme de la variation du teneur d'azote g/100ml dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation

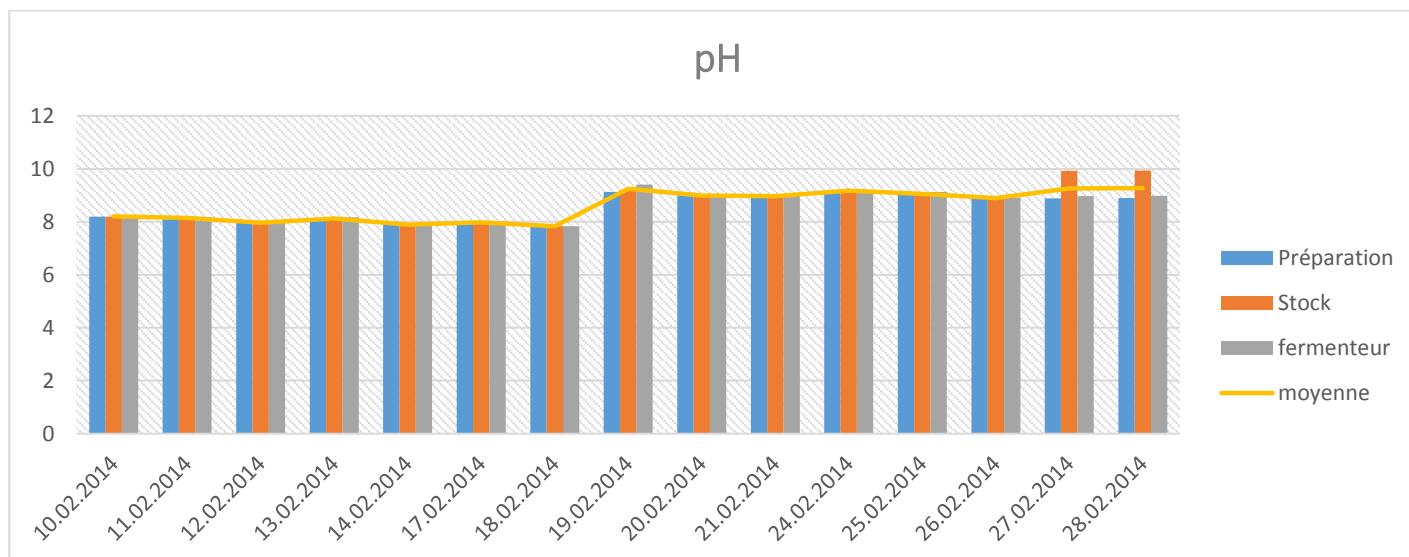


Figure 9: Histogramme de la variation de pH dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation

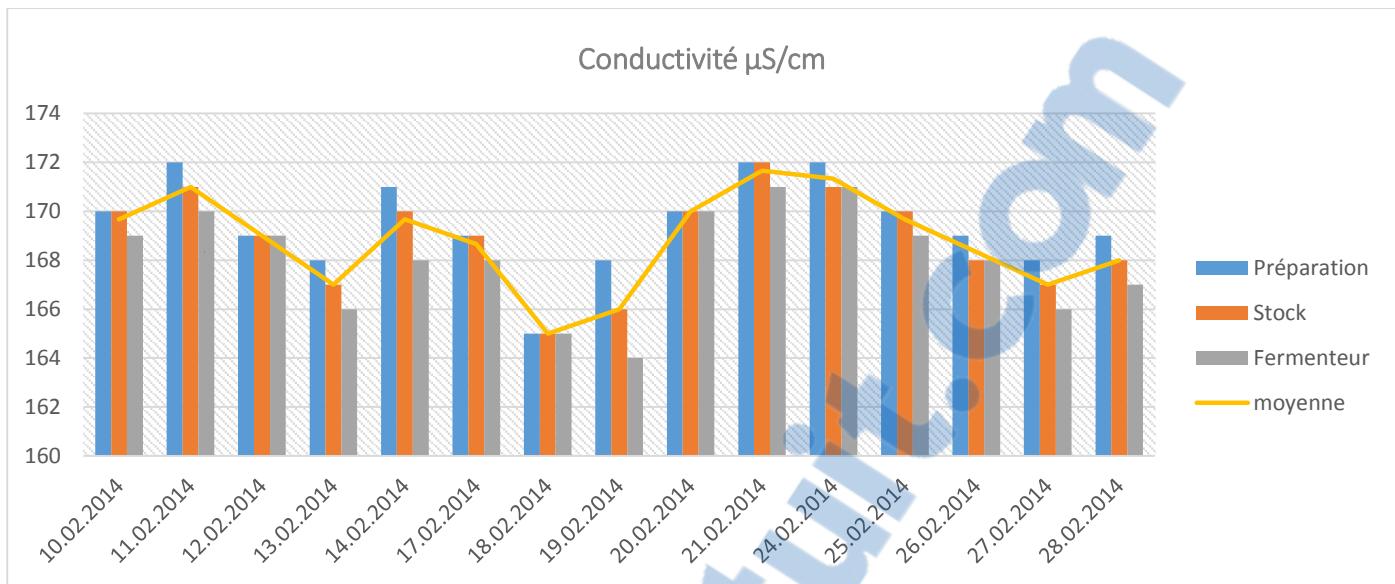


Figure 10: Histogramme de la variation de conductivité en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dans la solution de l'urée en fonction de stade de préparation

On remarque que la teneur de l'azote dans la solution de l'urée est variable sans dépasser les limites supérieur ou inférieur qui sont fixés entre 9-10g/100ml de solution. Pour le même échantillon nous avons remarqué un certain diminution de teneur d'azote au cours du temps qui est bien observé entre les différentes étapes de circuit des sels nutritifs. Le pH est stable au cours du temps par contre on remarque certain fluctuation de conductivité, mais il reste proche à celle de l'eau car l'urée est un sel organique qui ne se présente pas sous forme ionique. Aussi aucune contamination n'a été détectée dans le circuit de urée qui confirme qu'il est conforme à l'exigence et au norme.

#### IV-2- Mono-ammonium phosphate

Si dessous les histogrammes du variation du teneur d'azote, du  $\text{P}_2\text{O}_5$ , du pH et de conductivité dans la solution d'MAP du sa préparation jusqu'au le stade de fermentation.

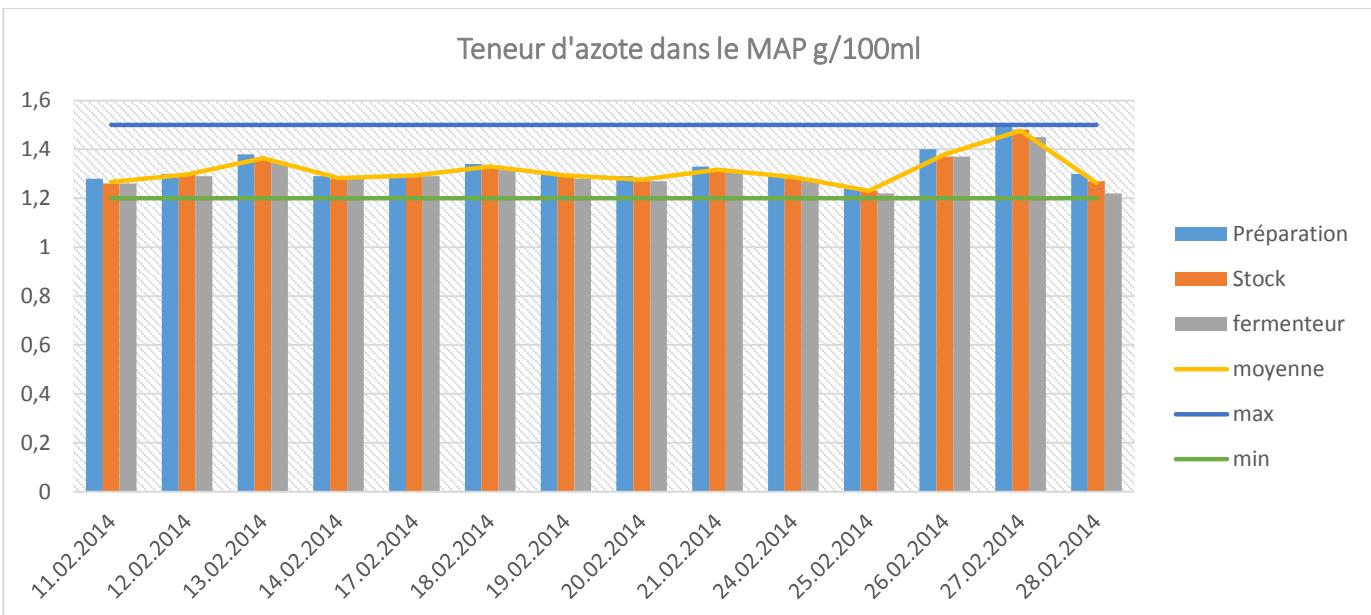


Figure 11: Histogramme de la variation du teneur d'azote en g/100ml de solution de MAP en fonction de stade de préparation

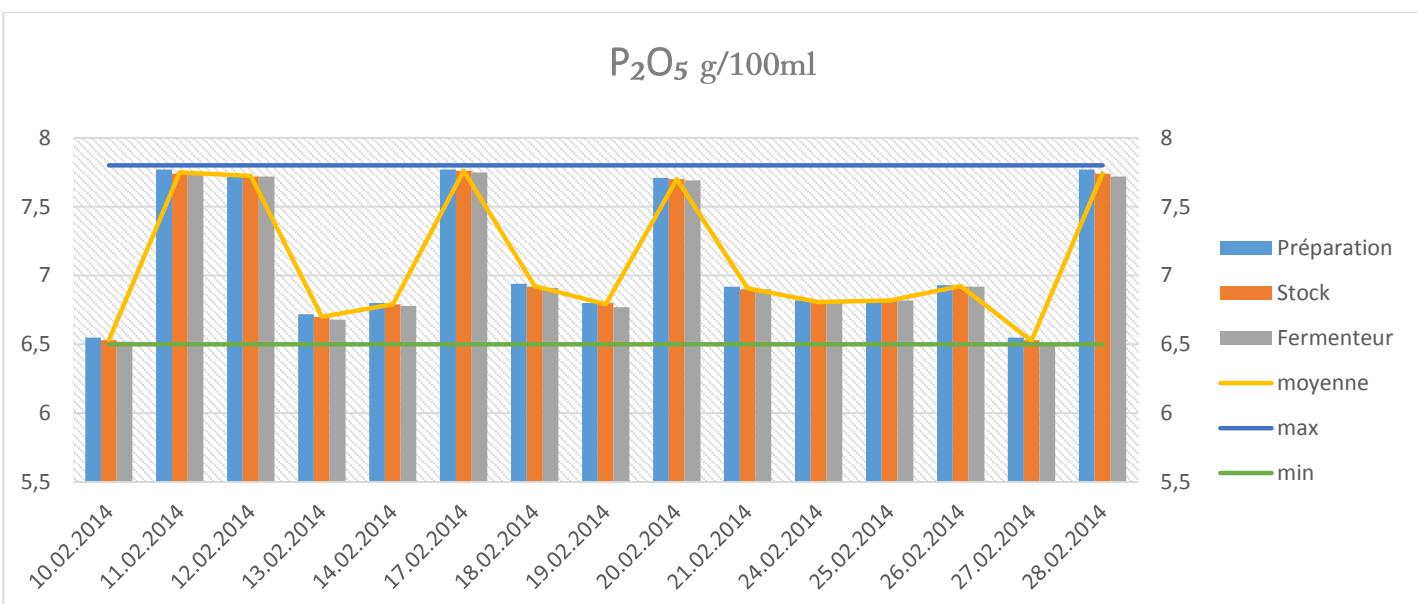


Figure 12: Histogramme de la variation du teneur  $\text{P}_2\text{O}_5$  en g/100ml de solution de MAP en fonction de stade de préparation

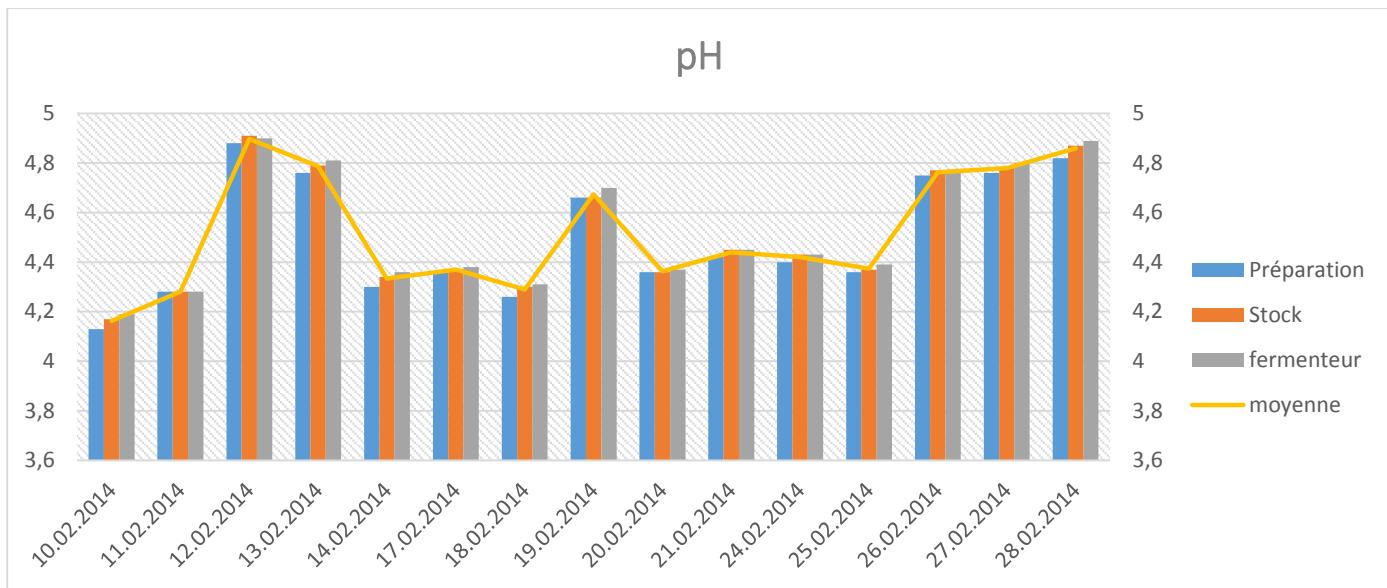


Figure 13: Histogramme de la variation de pH dans la solution de MAP en fonction de stade de préparation

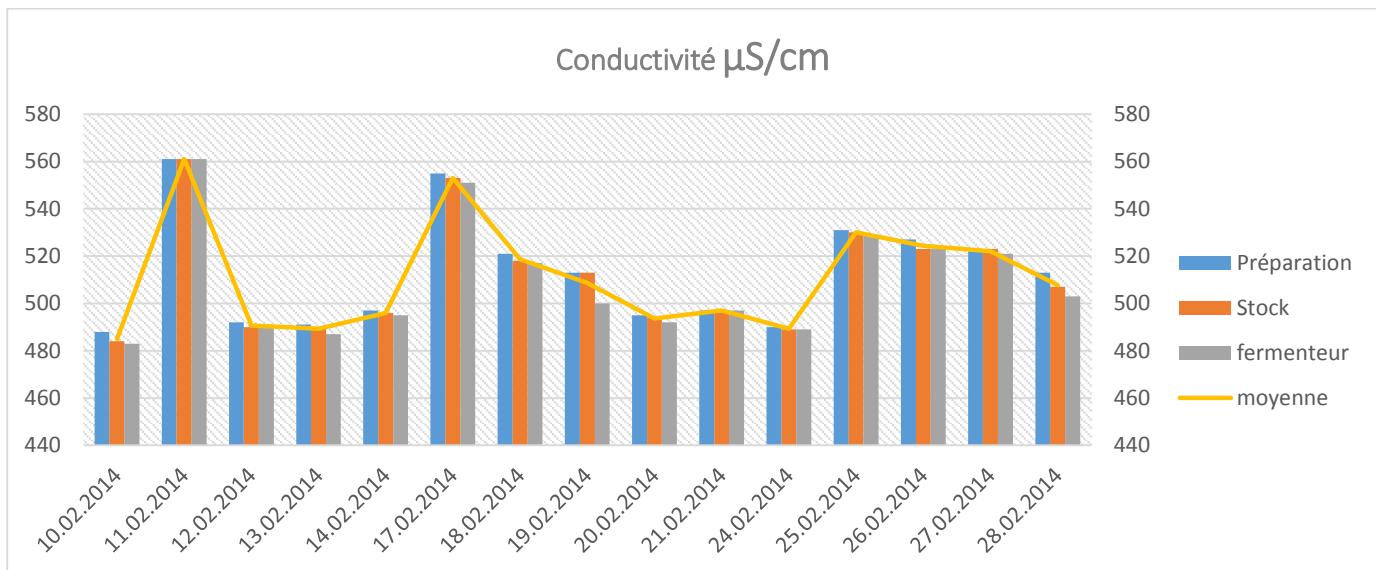


Figure 14: Histogramme de la variation de conductivité en µS/cm dans la solution de MAP en fonction de stade de préparation

On remarque que la teneur de l'azote et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> dans la solution de MAP sont variables mais sans dépasser les limites supérieur, ou inférieur, qui sont fixés entre 1.2-1.5g/100ml pour l'azote et 6.5-7.8g/100ml de solution pour le P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Pour le même échantillon nous avons remarqué un certaine diminution de teneur d'azote et P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> au cours du temps qui est bien observé entre les différents étages de circuit des sels nutritifs.

Le pH est stable au cours du temps par contre on remarque certaine fluctuation de conductivité, mais il reste inconsiderable. Aussi aucune contamination n'a été détectée dans le circuit de MAP qui confirme qu'il est conforme à l'exigence et au norme.

#### IV-3- Sulfate d'ammonium

Si dessous les histogrammes du variation du teneur d'azote, du pH , de conductivité et de charge microbiennes dans la solution de sulfate d'ammonium de sa préparation jusqu'au stade de fermentation.

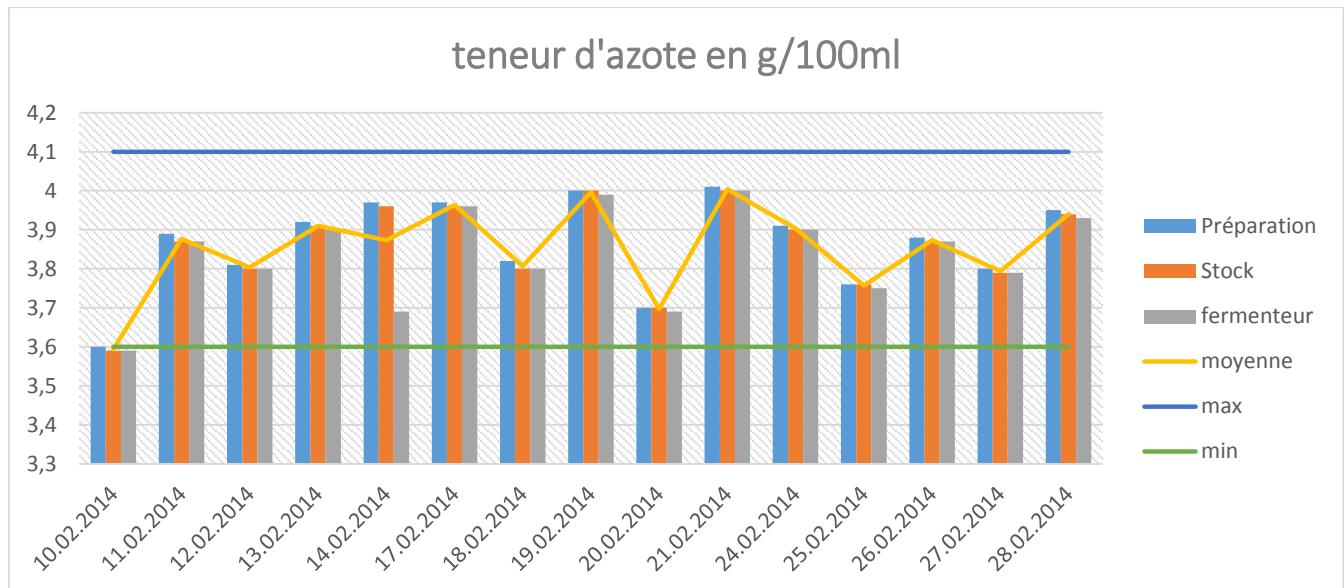


Figure 15: Histogramme de la variation du teneur d'azote en g/100ml dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation

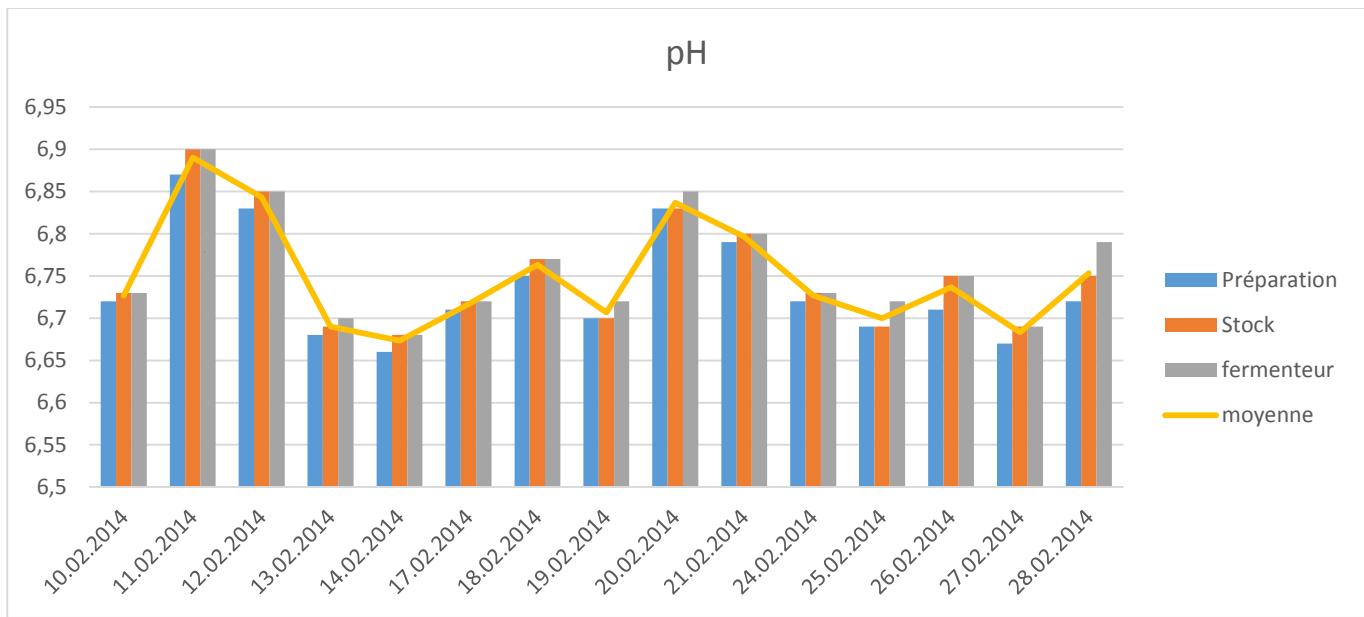


Figure 16: Histogramme de la variation de pH dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation

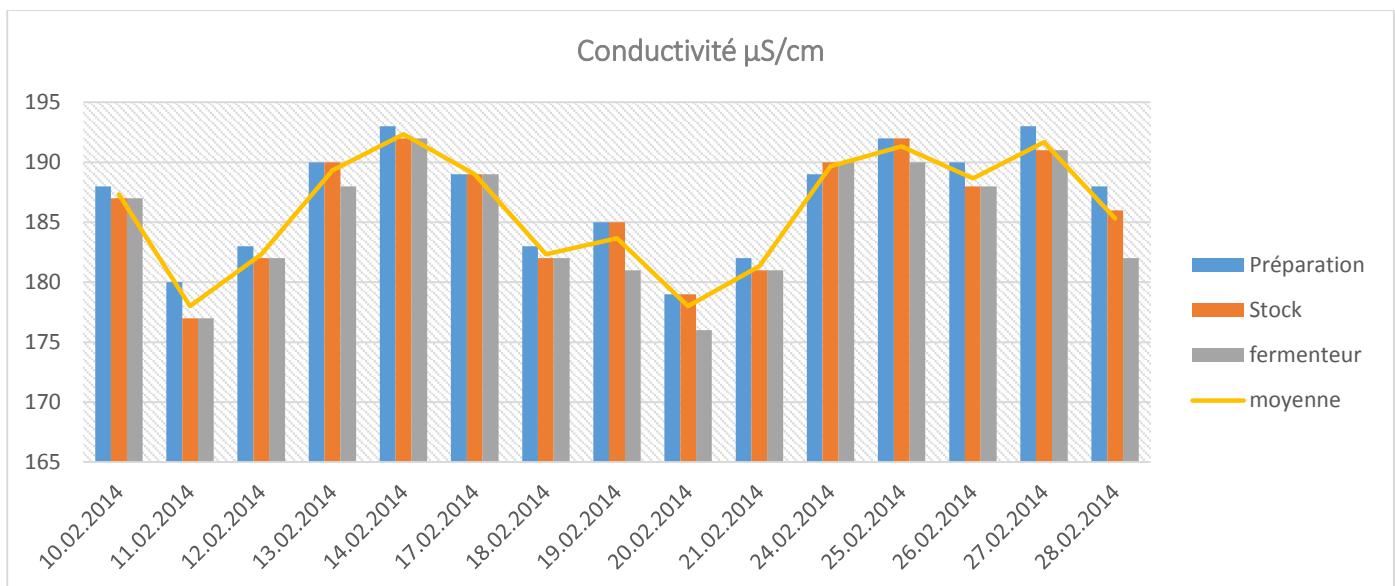


Figure 17: Histogramme de la variation de conductivité en  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dans la solution de sulfate d'ammonium en fonction de stade de préparation

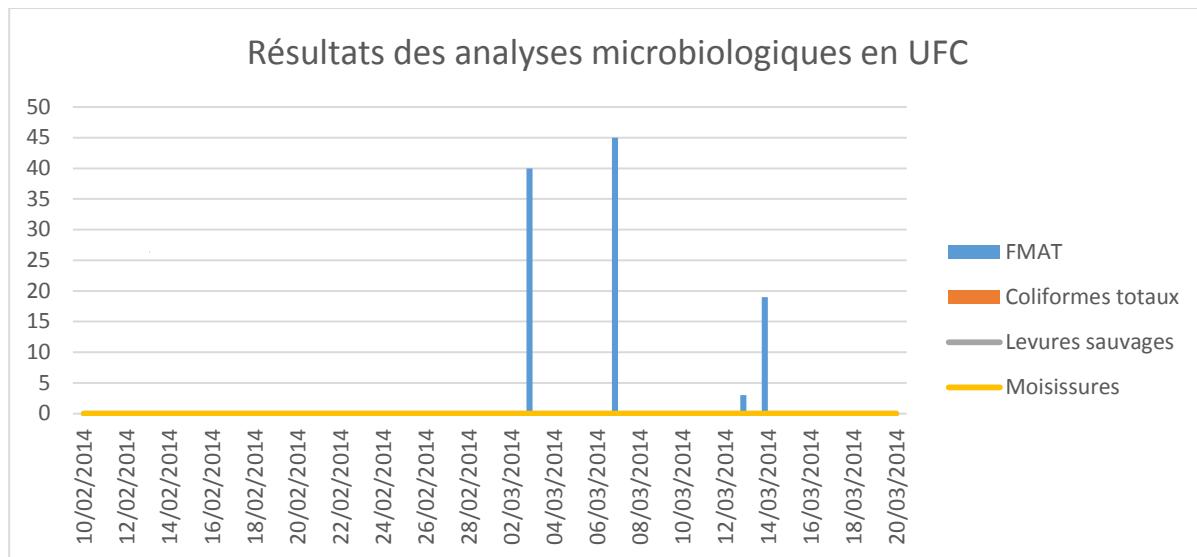


Figure 18: Histogramme de résultats des analyses microbiologique en UFC en fonction de stade de préparation

On remarque que la teneur de l'azote dans la solution de sulfate d'ammonium est variable sans dépasser les limites supérieur ou inférieur qui sont fixés entre 3.6-4.1g/100ml de solution. Pour le même échantillon on remarque une certaine diminution de teneur d'azote au cours du temps qui est bien observé entre les différents étages de circuit des sels nutritifs. On remarque une certaine fluctuation de pH et de conductivité qui reste insignifiante. Aussi des contaminations ont été détectées dans le circuit de sulfate d'ammonium, au stade de stockage le 03/03/14, qui ont été poussées sur le milieu GNG. Et par une observation microscopique on a pu déterminer qu'elles sont des Bacillus.

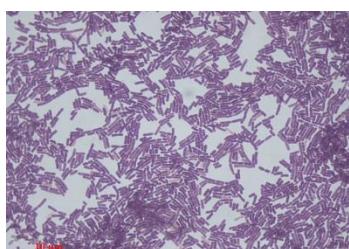


Figure 19: Photo de la Bacillus[2]

Notre recommandation était d'arrêter le travail avec ce bac et de faire nettoyer soigneusement le circuit. Le 13-03-14 nous avons détecté une nouvelle contamination par le Bacillus. Cette fois notre recommandation était de faire un nettoyage complet du circuit de sulfate d'ammonium et un arrêt temporaire qui a duré 5 jours.

## **V- Management de la sécurité**

Les bonnes pratiques d'hygiène (BPH) concernent l'ensemble des opérations destinées à garantir l'hygiène, c'est-à-dire la sécurité et la salubrité des aliments, Les bonnes pratiques d'hygiène comportent des opérations dont les conséquences pour le produit fini ne sont pas toujours mesurables,

### **V-1- Engagement et politique qualité**

La Direction de la société LESAFFRE s'engage à définir une politique basée sur la qualité, la sécurité et l'hygiène des denrées alimentaires. De ce fait, la maîtrise des risques alimentaires est fondée sur la méthodologie HACCP définie par le Codex Alimentarius.

Le Responsable Qualité a la responsabilité de la gestion du système de management de la qualité et de la sécurité des denrées alimentaire. Il lui est accordé l'indépendance organisationnelle nécessaire pour identifier et évaluer tous les problèmes liés à la sécurité alimentaire et à l'organisation de l'entreprise. Il est également responsable de la vérification des actions préventives et correctives entreprises dans les délais impartis et d'en vérifier l'efficacité.

La Direction reconnaît sa responsabilité dans le fait de supporter et d'assurer l'application des règles mises en place. Aussi, l'ensemble du personnel a la responsabilité de se tenir informé, de connaître et de maintenir les exigences décrites dans les procédures qui ont trait à leur domaine et leurs compétences.

### **V-2- Gestion du manuel qualité**

La rédaction du manuel Qualité est en charge du responsable qualité, il est également chargé de son actualisation et de sa diffusion.

Chaque membre du personnel a accès au manuel qualité. Pour ce faire, un exemplaire est disponible sur le réseau informatique interne et un exemplaire est également disponible auprès du responsable qualité. Le manuel qualité est également à disposition des clients et fournisseurs sur simple demande auprès du responsable qualité.

### **V-3- Equipe HACCP**

MR. A.BENANI responsable de qualité.

EL HASSOUNI ASMAE stagiaire.

### **V-4- Diagnostic des programmes préalables**

Avant d'élaborer ses plans HACCP, l'établissement doit élaborer et mettre en oeuvre des programmes préalables pour aider à limiter l'introduction possible de

dangers pour la salubrité des aliments produits due à l'environnement de travail et aux pratiques opérationnelles.

Les programmes préalables doivent être mis par écrit, mis à jour chaque fois que des modifications y sont apportées et réévalués au moins tous les ans. Ils contiennent six rubriques:

- Hygiène des locaux ;
- Hygiène des équipements ;
- Hygiène du personnel ;
- Hygiène du transport et du stockage ;
- Assainissement et lutte contre les nuisibles ;
- Procédure de rappel.

## V-4-1- Analyse de conformité

### 1- Check-list (annexe)

Une tournée d'observation a été menée à l'intérieur de l'usine afin de vérifier l'application des exigences de la check-list au sein de cette dernière, des remarques ont été rassemblées afin d'étudier la conformité des points déjà cités. Les points de chaque chapitre ont été jugé par rapport aux exigences de la façons suivante :

- **Satisfaisant** : si le but de l'exigence est bien respecté, comme il est décrit sur la check-list.
- **Non satisfaction** : si l'exigence n'est pas respecté ou si le critère audité répond mais pas totalement au but de l'exigence décrit sur la check-list afin de prendre en considération les failles du système des préalables de la société.
- **Non applicable** : si l'exigence n'a pas de lien avec le domaine d'activité de la société, ou si exigence est jugé non nécessaire. Dans ce cas une justification est notée sur la check-list.

### Pourcentage de satisfaction

Nombre de critère= nombre de critère total – critères non applicables.

Tableau 12:pourcentage de satisfaction des programmes préalables

Eléments	% de conformité	Objectif
Etablissement : conception et installation.	93%	100%
Etablissement : entretien et assainissement	91%	100%
Etablissement : hygiène corporelle	100%	100%
Transport	100%	100%
Formation	100%	100%

(14.1) (11.1)

Les résultats de la tournée d'observation qui a été menée à l'intérieur de l'usine afin de vérifier l'application des exigences de la check-list sont résumés sous forme de diagramme de radar.

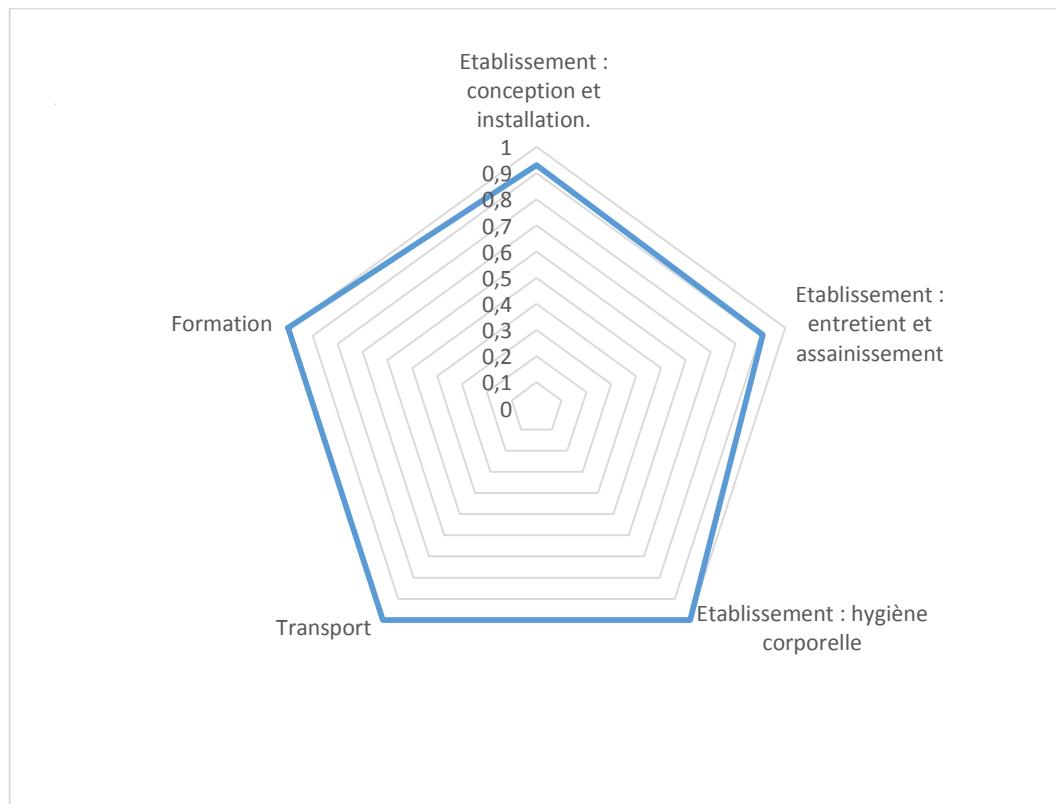


Figure 20: diagramme radar du % de conformité par chapitre.

### **Interprétation du résultat :**

D'après le diagnostic préliminaire du diagramme radar, on constate :

- Le chapitre établissement : entretien et assainissement ne satisfait que de 91% les exigences citées sur la check-list, c'est le plus faible degré de satisfaction.
- Le chapitre établissement : conception et installation satisfait moyennement les exigences de la check-list.
- Les autres chapitres ont des pourcentage de satisfaction plaisant.

### **V-4-2- Les mesures correctives**

D'après les résultats de l'analyse des programmes préalables, nous avons remarqué que les programmes préalables sont presque à 100% conformes.

- Fermeture des portes au sale de préparation pour la contrôle de qualité d'air.
- Fermeture de sale de préparation pour éviter l'accès des ravageurs.
- Formation de personnel.

- Installer un système de lutte contre les insectes et abeilles dans la salle de préparation.

## V-5- Analyse des dangers

### V-5-1- Identification des dangers

**Un danger** menace la sécurité d'une personne (hazard= the potential to cause harm). Un danger, c'est concret (toxine, microbe, métal, produit chimique...) Plus largement un "danger" est ce qui est néfaste pour le consommateur.

**Un risque** est la probabilité de manifestation du danger (risk en anglais).

Pour déterminer les causes pouvant être à l'origine des dangers identifiés, nous avons utilisé la méthode d'ISHIKAWA en se basant sur les 5 M.

Le diagramme d'Ishikawa (ou diagramme en arête de poisson, diagramme cause-effet ou 5M) C'est un outil qui permet à identifier les causes d'un problème. On a une vision globale des causes génératrices d'un problème avec une représentation structurée de l'ensemble des causes qui produisent un effet.

*Tableau 13: identifications des dangers dans le circuit des sels nutritifs*

Etapes	Danger	Causes	Mesures préventives	Mesures correctives
Tamisage	Physique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Débris des sacs.</li> <li>- Débris de verre.</li> <li>- Débris métallique (du personnel).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation des tamis.</li> <li>- Refaire le tamisage s'il est nécessaire.</li> </ul>	
Dilution	Biologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contamination d'eau par les microorganismes.</li> <li>- Contamination des cuves de préparation.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respecter le temps de contact du désinfectant.</li> </ul>	Augmenter le temps de contact du désinfectant ou utiliser autre types plus efficace
	Physique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Débris métallique provenant du circuit de l'eau ou des sels.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respecter les conditions de stockage des sels</li> </ul>	
Filtration	Physique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Passage de certains corps étranger.</li> <li>- Etat des filtres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mettre au point des règles de nettoyage des filtres</li> <li>- Entretien des filtres</li> </ul>	refaire la filtration pour l'élimination de tous les risques.
Stockage	Biologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contamination par l'eau</li> <li>- Mauvais nettoyage des citernes de stockage.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mettre au point des programmes de nettoyage des citernes de stockage</li> </ul>	
	Chimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nature et état de revêtement métallique pour éviter les réactions d'oxydation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le revêtement intérieur des citernes doit être inert : inox inoxydable anticorrosif</li> </ul>	
	Physique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présence des impuretés dans les fonds des citernes</li> </ul>		

## V-5-2- Evaluation quantitative et qualitative des dangers

Pour effectuer cette évaluation, nous avons eu recours à un système de cotation, ce qui nous a permis de hiérarchiser les dangers. Le système de cotation choisi tient compte de deux critères : la sévérité du danger et sa fréquence d'apparition. Nous avons choisi ensuite trois notes pour hiérarchiser ces critères (1, 3 et 5). le tableau d'évaluation est le suivant :

Tableau 14: critères d'évaluation des dangers

Critères	Classification	Notation
Sévérité	<b>Mineur</b> : pas de conséquence sur la santé du consommateur	1
	<b>Majeur</b> : conséquence limité sur la santé du consommateur	3
	<b>Critique</b> : conséquence grave sur la santé du consommateur	5
Fréquence	<b>Rare</b> : faible probabilité d'apparition du danger	1
	<b>Modéré</b> : apparition occasionnelle du danger	3
	<b>Très fréquent</b> : forte probabilité d'apparition du danger	5

$$\text{Criticité} = \text{Sévérité} * \text{fréquence} \quad \text{et} \quad 1 < C < 25$$

Tableau 15: évaluation des dangers dans le circuit des sels nutritifs

Opération	Danger	Evaluation de criticité		
		sévérité	Fréquence	criticité
Tamisage	Physique			
	- pierre	3	1	3
	- Métaux	5	3	15
	- Verre	3	1	3
	- Insectes	3	5	15
	- Ravageurs	5	3	15
	- bois	1	3	3
Dilution	Biologique	5	1	5
	-			
	Contamination microbiens			
Filtration	Physique			
	- Débris métalliques	5	1	5
Stockage	Physique			
	- corps étrangers.	5	1	5
	- Impuretés	3	3	9

D'après l'analyse de l'évaluation des dangers, ceux ayant le plus grand degré de criticité sont les métaux, les insectes et les impuretés.

Dans le but de maîtriser ces dangers, les mesures correctives suivantes sont prévues :

- L'installation d'un tamisage au niveau de chaque citerne de préparation.
- Utilisation de double filtre au niveau de filtration.
- Lutte contre les insectes et abeille.

## V-6- Détermination des points critiques

La détermination des points critiques de la maîtrise est le second principe du système HACCP,

Selon NF V 01-002 :2003 point critique pour la maîtrise c'est une étape à laquelle une mesure de maîtrise peut être exercée pour prévenir ou éliminer un danger menaçant la sécurité des aliments ou le ramener à un niveau acceptable,

La détermination d'un CCP dans le système HACCP peut être facilitée par l'application d'un arbre de décision,

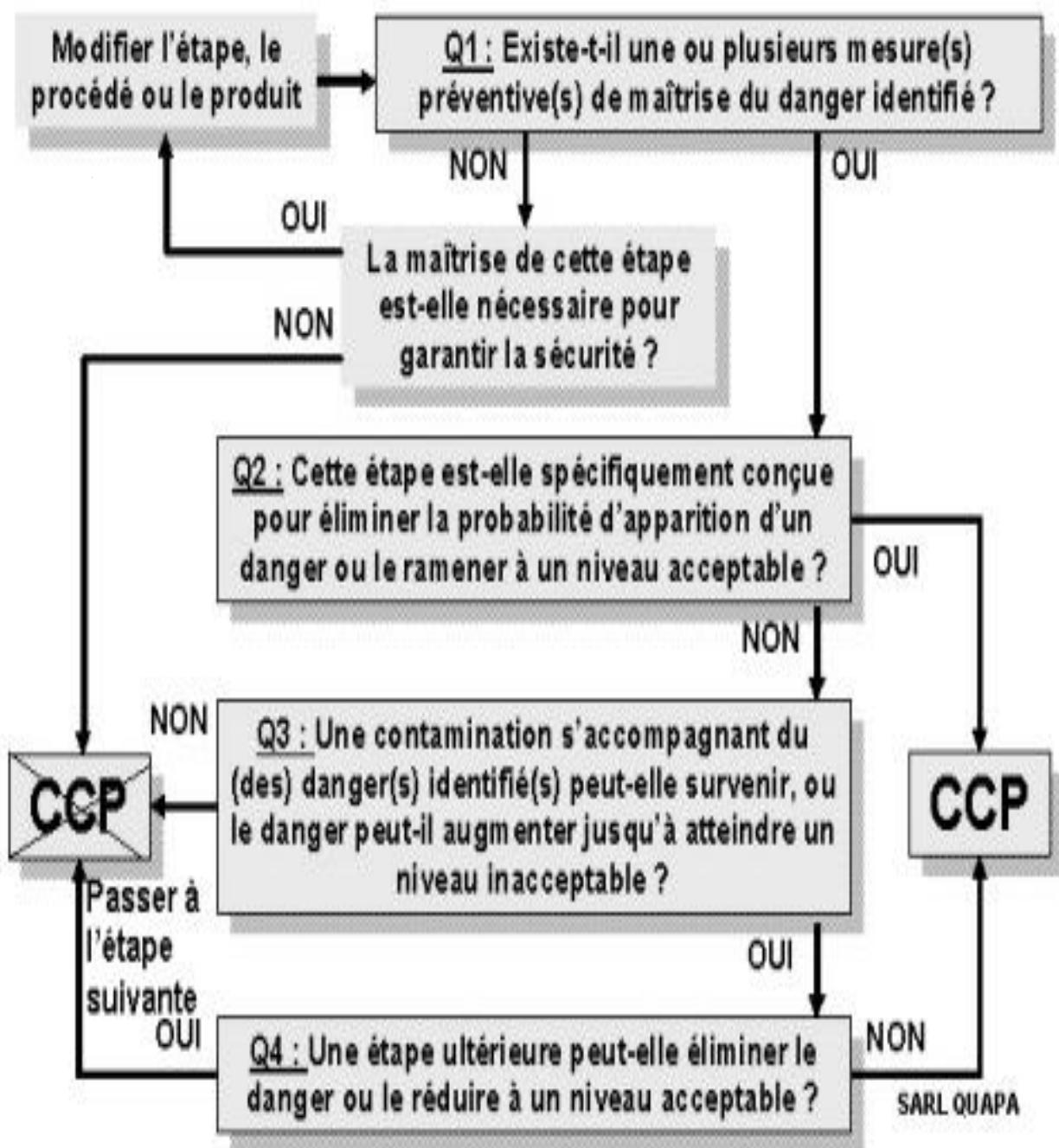


Figure 21: arbre de décision pour déterminer les CCP

Après appliqué cette arbre de décision, nous avons

*Tableau 16: détermination des CCP dans le circuit des sels nutritifs*

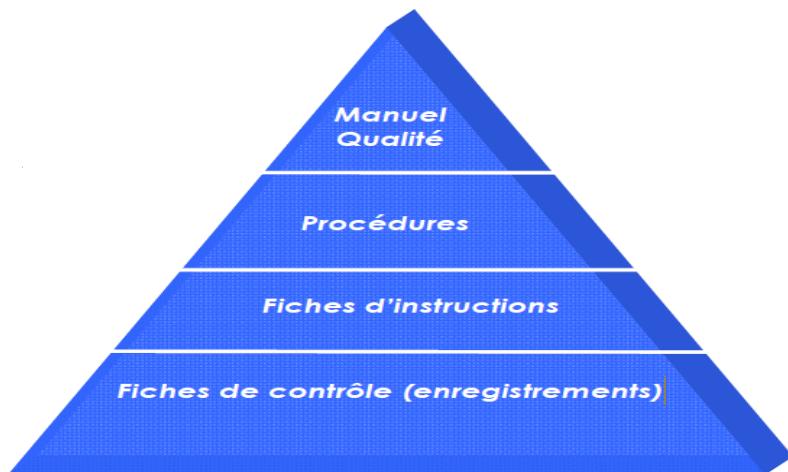
Etape	Danger	Q1	Q2	Q3	Q4	Décision	Mesure corrective
Dilution	Métaux + contamination	Oui	Non	Oui	Non	CCP	- Filtration - Refaire la filtration en cas nécessaire
Filtration	- Etat de filtre - Corps étranges	Oui	Oui	-	-	CCP	
Stockage	- Impuretés	Oui	Non	Non	-	Pas CCP	Transfert par aspiration pour diminuer le taux d'impuretés

## V-7- Vérification du système HACCP

L'entreprise dispose d'un programme de vérification et de maintien du système HACCP. Ces vérifications sont réalisées périodiquement afin d'examiner l'application du système.

Le programme de vérification comprend les tâches, les responsabilités, les fréquences, les méthodes, les procédures, les tests, les inspections, les audits internes, les résultats du système de surveillance, sa conformité ou non avec la législation et la réglementation en vigueur.

## V-8- Documentation



### Maîtrise des documents et des enregistrements

Tous les documents relatifs au système qualité respectent les dispositions définies dans la procédure de Gestion des documents. Cette procédure décrit les trois types de documents ainsi que la rédaction, la révision, la diffusion et l'archivage de ces mêmes documents.

## Conclusion

Au Terme de ce stage, effectué au service laboratoire LESSAFRE Maroc, nous nous sommes intéressés à la maîtrise et validation du circuit des sels nutritifs par :

- suivi et maîtrise physico-chimique et microbiologique des sels nutritifs,
- revalidation des programmes préalables et puis la validation du système HACCP pour le circuit des sels nutritifs.

Les analyses physico-chimiques visent la détermination du pourcentage du taux d'azote, du taux de phosphate, pH et de la conductivité aux différentes stades du circuit de préparation des sels et le suivi de leur variation au cours du temps. Par contre les analyses microbiologiques visent la sécurité des sels de tous sorte de contamination qui peut influencer la croissance des levures. Ce suivi a permis de détecter deux contaminations microbiennes par des Bacillus au stade de stockage des sulfates d'ammonium et de les corriger par un nettoyage complet du circuit du sulfate d'ammonium.

La démarche qualité mise en place dans les industries agroalimentaires vise à garantir la conformité de leur production à un ensemble de critères et répond en cela aux exigences de sécurité des consommateurs. La revalidation des programmes préalables se basant sur la méthode des 5M et check-list, nous a suggéré comme mesures correctives : la Fermeture des portes de la salle de préparation pour la contrôle de la qualité d'air, la formation du personnel et l'installation d'un système de lutte contre les insectes et abeilles dans la salle de préparation. Puis nous avons validé la démarche HACCP dans le circuit des sels nutritifs par une analyse des dangers puis une détermination des points critiques. Nous avons pu ajouter une étape de filtration dans le circuit de traitement des sels entre l'étape de dilution et stockage pour éliminer une CCP.

A la lumière des analyses réalisées, le bilan de ce stage s'avère positif, Il nous a permis de perfectionner et de confronter nos connaissances théoriques et pratiques acquises durant nos études universitaires, Aussi nous avons développés nos relations interpersonnelles et acquis une méthode de travail et de la discipline de soi,

## References

- 1 ]LARPENT, J. (s.d.). *Biotechnologie des levures*. MASSON.
- 2 ]verne-bourdais, C. B. (2002). *Microbiologie et qualité dans les industrie agroalimentaires*.
- 3 ]Guirauud, j.-p. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Paris: DUNOD.
- 4 ]HAYNES, H. C. (s.d.). *chimie organique analyse quantitative et qualitative*.
- 5]www.lesaffre.com. (n.d.).
- 6 ]hind, I. (2010). Mémoire de fin d'étude master CAC Agiq ,l'optimisation du test de conservation de 10 h à 43°C et évaluation de la stabilité de la levure pressée à LASAFFRE Maroc.
- 7 ]boutou, O. (2006). *Management de la sécurité des aliments de l'HACCP à l'ISO 22000*. AFNOR.
- 8 ]Blanc, A. L. (2007-2008). *ENSMIC –ALIMENTATION HUMAINE*. Condensé de cours.
- 9 ]Vierling, G. L.-E. (2001). *Microbiologie et toxicologie des aliments*. doin.
- 10 ]M.Larpent-Gourgand, J.-S. (1992). *Biotechnologies principes et méthodes*. Paris: doin.
- 11 ]feinberg, M. (2004). *validation des méthodes d'analyses*. paris: dunod.
- 12 ]baillargeon, G. (2003). *statistique appliquée*. France: SMG.
- 13 ]baillargeon, g. (1995). *maîtrise statiqtique ds procédés*. Québec: SMG.
- 14]aliments, A. c. (n.d.). Section 3 - Documentation du système HACCP. *Manuel du programme d'amélioration de la salubrité des aliments*.
- 15]Shonnard, D. (n.d.). Chapter 9: Operating Bioreactors. Department of Chemical Engineering Michigan Technological University.
- 16]directives générales concernant les méthodes de rechrche N.V, 0.-0. (n.d.).
17. (n.d.). microbiologie alimentaire directives générales pour le dénombrement.
18. (n.d.). microbiologie directives générales pour le dénombrement sans revivification.
- 19 ]Eaton, A. L. (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- 20 ]Marshall, R. (. (1992). Standard methods for the microbiological examination of dairy products, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
- 21 ]Chemists, A. o. (1995). Official methods of analysis of AOAC International, 16th ed. AOAC International. Arlington, VA.
- 22 ]Vanderzant, C. a. (1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

- 23]LEIFSON, E. (1935). New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water. Journal of Pathology and Bacteriology. 40:581-599.
24. (17 février 1985.). Journal Officiel du Méthodes d'analyses des laits pasteurisés (Arrêté du 3 janvier 1985).
- 25]M., H. J. (1973). genetic control of the cell division cycle in yeast.V. genetic analysis of cdc mutants. genetics 74.267-286.
- 26 ]A.A., M. E. ((1957)). , J. Inst. Brew. 63 (1), 34-35.
- 27 ]M.R, W. L. (1953). J. Inst. Brew. 59, 401.
- 28 ]R.R, F. (1965). J. Appl. Bact. 28, 373-383.
29. (6 June 2014). Budding Yeast: *Saccharomyces cerevisiae*. *Kimball's Biology Pages*.

## **Annexe**

### **Gélose nutritive gélosé [16]-[22]**

#### **PRINCIPE**

La Gélose Nutritive est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Elle est recommandée dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits .

#### **FORMULE**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	5,00
Extrait de viande de bœuf	3,00
Agar	15,00

pH final à 25°C : 6,8 ± 0,2

#### **CONSERVATION**

Le milieu en flacons et tubes se conserve entre 15 et 25°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Le milieu en boîtes se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

#### **EQUIVALENCE**

Ce milieu est conforme à la formulation de la Gélose Nutritive décrite dans les normes AFNOR V08-013, V08-017 et V08-021.

#### **UTILISATION**

Se conformer aux protocoles en vigueur.

### **DESOXYCHOLATE LACTOSE AGAR [23]-[25]**

#### **PRINCIPE**

Est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des bactéries coliformes dans les eaux, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Ce milieu est également employé pour la différenciation et l'isolement des entérobactéries à partir des prélèvements d'origine animale.

#### **PREPARATION**

Mettre en suspension 42,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ne pas autoclaver.

## FORMULE – TYPE

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande ..... 10,00 g
- Lactose ..... 10,00 g
- Désoxycholate de sodium..... 0,50 g
- Chlorure de sodium..... 5,00 g
- Citrate de sodium..... 2,00 g
- Rouge neutre ..... 0,03 g
- Agar agar bactériologique..... 15,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,1 ± 0,2.

## LYSINE [26]-[28]

Le milieu à la lysine est un milieu complexe, pour l'isolement et la numération des levures sauvages dans les levures de culture. qu'aucune souche normale de *S. cerevisiae* ou *S. carlsbergensis* n'utilise la lysine alors que beaucoup d'autres levures, y compris les levures sauvages l'utilisent.

## FORMULE

COMPOSITION	(grammes/litre)
Glucose	44,5
Dihydrogénophosphate de potassium	1,78
Sulfate de magnésium	0,89
Chlorure de calcium fondu	0,178
Chlorure de sodium	0,089
Adénine	0,00178
DL-méthionine	0,000891
L-histidine	0,000891
DL-tryptophane	0,000891
Acide borique	0,0000089
Sulfate de zinc	0,0000356
Molybdate d'ammonium	0,0000178
Sulfate de manganèse	0,0000356
Sulfate de fer	0,0002225

Lysine	1,0
Inositol	0,02
Pantothénate de calcium	0,002
Aneurine	0,0004
Pyridoxine	0,0004
Acide p-aminobenzoïque	0,0002
Acide nicotinique	0,0004
Riboflavine	0,0002
Biotine	0,000002
Acide folique	0,000001
Agar	17,8
pH (voir indications)	

500 grammes permettent de préparer 7,5 litres de milieu.

## PREPARATION

Verser 6,6 g de poudre dans 100 ml d'eau distillée contenant 1,0 ml de lactate de potassium à 50 % (SR0037). Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète en agitant fréquemment pour éviter toute surchauffe. Refroidir à 50°C et ajouter 0,1 ml d'acide lactique à 10 % (SR0021) pour ajuster le pH à  $5,0 \pm 0,2$ .

## CONSERVATION

Conserver le milieu déshydraté à 10–25°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Conserver le milieu prêt à l'emploi à 2–8°C.