

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة سعيدة, الدكتور مولاي الطاهر
Université de Saida Dr-MOULAY Tahar



N° d'Ordre

كلية علوم الطبيعة والحياة
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
En Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Thème

Production de levure boulangère : Analyse des paramètres de fermentation et de rendement

Présenté par :

- Melle : boutaiba nesrine
- Melle: bouaoudj siham

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. Bellil yahia

Pr Université UMTS

Examineur

Mr. Benabbou taha ahmed

MCA Université UMTS

Rapporteur

Mr. Benregueig Mokhtar

MAA Université UMTS

Année universitaire 2023/2024

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة مولاي الطاهر، سعيدة
Université MOULAY Tahar, Saïda



N° d'Ordre

كلية العلوم الطبيعية والحياة
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
قسم البيولوجيا
Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master
En Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée
Thème

Production de levure boulangère : Analyse des paramètres de fermentation et de rendement

Présenté par :

- Melle : boutaiba nesrine
- Melle: bouaoudj siham

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président

Mr. Bellil yahia

Pr Université UMTS

Examineur

Mr. Benabbou taha ahmed

MCA Université UMTS

Rapporteur

Mr. Benreguieg Mokhtar

MAA Université UMTS

Année universitaire 2023/2024

Dédicaces

Grâce à Dieu tout le Puissant qui m'a inspiré qui m'a guidé dans le bon chemin, je vous dois ce que je suis.

* A mes très chers parents : Mostapha et Acher Z...

Aucun mot aucun dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être... Merci.

_ Puisse dieu leur accorder santé bonheur. Prospérité et longue vie afin que je puisse un jour combler de joie leurs vieux jours.

* A mes chers frères et mes belles sœurs : bouziane - Houda - Wafaa et Mohamed : la lumière de ma vie que dieu leur apporte le bonheur du monde et protège - les du mal.

* A mes nièces et son fils : wiaam-hadil-soujoud et Mazen .

* Toute ma famille : boutaiba Acher

* A notre encadrants Pr. Benreguieg Mokhtar et Dr. Aouad hajer pour leur grand soutien scientifique et moral . pour les conseils et les suggestions qu'ils nous apporter pour réalisation ce modeste travail... sincèrement merci

* A ma chère binôme {Siham} pour son soutien moral sa patience et sa compréhension tout au long ce projet merci pour l'amitié.

* A ma chère et aimable sœur {chahinez} et toute sa famille : pour son amour cordial et son appui la bonté elle-même c'est l'amitié au vrai sens du mot.

* A ma belle amie { Hayat} et son frère Boumediene : merci pour toute l'aide et soutien qu'ils ont consentis durant mes études que dieu vous bénisse et vous protège.

Boutaiba nesrine

Dédicaces

A mes parents pour leurs soutiens infaillibles leurs amour et leurs encouragement constants tout au long ce parcours

A mes encadrant mr. Bergige mokhtar et M.Aouad Hadjer

Je dédie ce mémoire avec toute ma gratitude et mo, respect a mes professeur encadrent pour leur patience, leur professionnalisme et leur conseils précieux qui ont guidé mes pas vers l'aboutissements de ce travail.

A mes enseignant Mr.Ben Abou et Mr.Bellil pour leurs accompagnement leur patience et leurs précieux conseils.

A tous ceux qui ont inspiré et soutenue dans la réalisation de ce travail

Je dédie ce mémoire avec une profonde gratitude

Bouaoudj siham

Remerciements

Le présent travail à été réalisée au département de Biologie de la faculté des Sciences de la nature et de la vie de l'université Dr. Moulay TAher de Saïda .

Nous remercions Dieu le tout puissant pour la volonté.la patience et le courage qu'il nous a accordé pour mener à terme ce travail.

nous tenons à exprimer notre sincère reconnaissance à Pr.Benreguieg Mokhtar pour avoir accepté de nous encadrer.pour son attention discrète.ses recommandations mesureés et ses précieux conseils et surtout pour ses qualités humaines et scientifiques en toute modestie.sa passion du métier qu'il sait rendre contagieuse et la confiance qu'il a bien voulu nous accorder tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadrente Dr.Aouad Hajer également de la faculté des sciences économiques pour nous avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet.pour le soutien, sa disponibilité et pour toute sa gentillesse et sa serviabilité.

* Nous voudrions ensuite remercie nos enseignants ,les membres du jury qui vont juger ce travail et nous faires profiter de leur connaissances et remarques constructives.

_Mr.Bellil YAhia qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

_ Mr.Benabbou Taha Ahmed qui a spontanément accepté d'examiner ce travail leur critiques et commentaires seront bénéfiques pour enrichi nos connaissances dans ce domaine.

* Nos sincères remerciements Mr.Senouci Alaa informaticien qui nous avoir beaucoup soutien et aidés à la réalisation de cette mémoire.

* Tous nos remerciements les responsables de Incubateur des travaux universitaires de Saïda et notre estime vont à tous les enseignants du faculté des sciences de la nature et de la vie.

*Enfin . Nos remerciements aussi à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Liste des abréviations

ARV : Abréviation

YPG: culture (yeast peptone glutamine)

SC: *saccharomyces cervisiae*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Larpent,1992).....	6
Tableau 2 : Les principales applications de <i>S. cerevisiae</i> (Camonis, 1990).....	9
Tableau 3: Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures (modifié de: Walker et White, 2005).....	18
Tableau 4 Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes (COFALEC, 2006).....	23
Tableau 5 : Composition de la cellule.....	26
Tableau 6 principaux critères d'une levure fraîche.....	31
Tableau 7 : Ensemble des caractères macroscopiques (Callon, 1997).	48
Tableau 8 :représentation de la cinétique d'une croissance	61
Tableau 9: Quantités de CO ₂ et d'éthanol résultant de la fermentation alcoolique.....	63
Tableau 10 : représentation de l'impact de la concentration sur l'absorbance	65

Liste des figures

Figure 1 : Micrographie de <i>S. cerevisiae</i> (Tortora et Anagnostakos, 1987).....	7
Figure 2 : Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i> (Bourgeois et Larpent, 1996).	7
Figure 3 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (Thuriaux, 2004).	11
Figure 4 : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).....	13
Figure 5 : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).....	14
Figure 6 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)	14
Figure 7 : Schéma des différents domaines d'utilisation des levures (Bourat,1992).	22
Figure 8 : reproduction de la levure par bourgeonnement en milieu aérobie	27
Figure 9 : cellule de levure	28
Figure 10 : transformation du maltose par la cellule de levure.....	29
Figure 11 : transformation par la levure d'une mole glucose en milieu anaérobie.....	29
Figure 12 : représentation activité des levures dans les pates.....	31
Figure 13 : paramètres influençant l'activité levurienne	35
Figure 14 : transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu aérobie.....	37
Figure 15 : fabrication de la levure de boulangerie	38
Figure 16 : fabrication de levure boulangère	39
Figure 17 : représentation de fermentation des raisin	44
Figure 18 : présentation dilution des solution liquide	45
Figure 19 : conservation de la souche	47
Figure 20 : représentation la cinétique d'une croissance	49
Figure 21 : Dispositif de mesure du CO ₂ produit permettant la collecte du gaz (Pol,1996).....	51
Figure 22 : Observation macroscopique de certains isolats de levures isolés.	60
Figure 23 : Observation microscopique de certains isolats de levures isolés.	61
Figure 24 : le résultat du teste catalase	61
Figure 25 : Détermination des phases de la croissance : courbe $\ln(T60) = f(t)$	62
Figure 26 : représentation l'impact de la concentration sur l'absorbance	65

Résumé

Ce travail a porté sur l'isolement et l'identification de la souche *Saccharomyces cerevisiae* en vue de sa valorisation pour la production de levure boulangère. Dans un premier temps, la souche a été isolée à partir des résins et caractérisée sur le plan microbiologique. Ensuite, un procédé de fermentation a été mis en œuvre pour produire cette levure, suivi d'un séchage pour obtenir un produit final utilisable.

Des analyses ont été réalisées pour évaluer certaines propriétés technologiques clés de la levure produite, notamment sa capacité à fermenter les sucres, sa production d'éthanol, ainsi que la génération de dioxyde de carbone, un indicateur essentiel de son efficacité dans les applications boulangères. Les résultats obtenus confirment le potentiel de cette souche pour des applications industrielles dans la panification, avec des performances technologiques comparables à celles des levures commerciales.

Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour une production locale de levure boulangère, réduisant ainsi la dépendance aux produits importés et offrant une alternative durable dans un cadre économique et écologique.

Abstract

This study focused on the isolation and identification of the *Saccharomyces cerevisiae* strain for its potential use in baker's yeast production. Initially, the strain was isolated from resins and microbiologically characterized. Subsequently, a fermentation process was implemented to produce the yeast, followed by drying to obtain a final usable product.

Analyses were conducted to evaluate key technological properties of the produced yeast, including its ability to ferment sugars, ethanol production, and carbon dioxide generation, a crucial indicator of its efficiency in baking applications. The results confirm the potential of this strain for industrial applications in breadmaking, with technological performance comparable to that of commercial yeasts.

This work opens promising perspectives for local baker's yeast production, reducing reliance on imported products and offering a sustainable alternative within an economic and ecological framework.

الملخص

يهدف استخدامهما في إنتاج الخميرة الخاصة *Saccharomyces cerevisiae* ركز هذا العمل على عزل وتحديد سلالة في البداية، تم عزل السلالة من بالمخابز العنب بعد ذلك، تم تنفيذ عملية تخمير. وتوصيفها من الناحية الميكروبيولوجية لإنتاج الخميرة، تلتها عملية تجفيف للحصول على المنتج النهائي القابل للاستخدام

، تم إجراء تحاليل لتقييم الخصائص التكنولوجية الرئيسية للخميرة المنتجة، بما في ذلك قدرتها على تخمير السكريات تؤكد النتائج إمكانات. وإنتاج الإيثانول، وتوليد ثاني أكسيد الكربون، وهو مؤشر أساسي على كفاءتها في تطبيقات المخازن. هذه السلالة للتطبيقات الصناعية في صناعة الخبز، مع أداء تكنولوجي مشابه لأداء خمائر المخازن التجارية

يفتح هذا العمل آفاقاً واعدة لإنتاج محلي للخميرة الخاصة بالمخابز، مما يقلل الاعتماد على المنتجات المستوردة ويقدم بديلاً مستداماً في إطار اقتصادي وبيئي

Table des matières
PARTIE I CONTENTS

DEDICACES.....	3
REMERCIEMENTS	5
LISTE DES ABREVIATIONS	I
LISTE DES TABLEAUX	II
LISTE DES FIGURES	III
TABLE DES MATIERES	VII
PARTIE II INTRODUCTION	1
I.1. Introduction.....	2
PARTIE III SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I.2. Données sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
I.2.1. Définition.....	6
I.2.2. Classification	6
I.2.3. Morphologie	7
I.2.4. Reproduction.....	7
I.2.5. Conditions de culture de la levure <i>S. cerevisiae</i>	7
I.3. Etude fondamentale des levures	9
I.3.1. Caractéristiques microbiologiques des levures	9
I.3.2. La membrane plasmique (ou le plasmalemm)	11
I.3.3. Le cytoplasme et ses organites	12
I.3.4. Le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi et les vacuoles.....	12
I.3.5. Reproduction.....	13
I.4. Différenciation des levures	15
I.4.1. Caractères botaniques	15
I.4.2. Caractères morphologiques	15
I.4.3. Caractères biochimiques	15
I.4.4. Caractères moléculaires	16
I.4.5. Classification des levures.....	16
I.4.6. Physiologie et croissance des levures	17
I.4.7. Les conditions physicochimiques de croissance	19
I.4.8. Le métabolisme.....	20
I.5. Levure Modèle génétique universel.....	21
I.5.1. Levures en biotechnologie.....	21
I.5.2. Boissons alcoolisées	22
I.5.3. Panification.....	22
I.5.4. Affinage des fromages	22
I.5.5. Production d'alcools industriels	23
I.5.6. Autres utilisations.....	23
I.5.7. Avantage des levures en industrie.....	23

I.1. La cellule de levure :.....	26
I.2. Les levures : les micro-organismes les plus cultivés	26
I.3. Schéma de fonctionnement :	28
I.4. Transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu anaérobie :.....	29
I.5. Activité des levures dans les pâtes :.....	30
I.6. Dosage de la levure en panification	30
I.6.1. Doses usuelles.....	30
I.6.2. Incorporation de la levure	30
I.7. Qualités d'une levure fraîche : principaux critères.....	31
I.8. Présentation commerciale de la levure.....	32
I.9. Les différentes formes commerciales.....	32
I.9.1. Levure liquide.....	32
I.9.2. Levure pressée	32
I.9.3. Levure émietlée	33
I.9.4. Levure sèche à réhydrater	33
I.9.5. Levure sèche instantanée	33
I.9.6. Levure à humidité Intermédiaire surgelée	34
I.10. Caractéristiques qualitatives spécifiques	35
I.11. Paramètres influençant l'activité de la levure :	35
I.11.1. Influence de l'hydratation:	36
I.11.2. Influence du pH :.....	36
I.11.3. Influence de la température :	36
I.11.4. Influence de la pression osmotique :	36
I.11.5. Influence de la concentration en alcool :.....	37
I.12. Production industrielle de la levure	37
I.12.1. Transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu aérobie	37
I.12.2. Fabrication de la levure	38
PARTIE IV MATERIEL ET METHODES	42
I.1. Technique de prélèvement	43
I.2. Préparation du milieu de culture (Sabouraud) (YPG).....	43
I.2.2. Milieu YPG / Yeast peptone Glucose	43
Méthodes d'isolement de la levure.....	44
1. Isolement	46
2. Purification des levures	47
I.12.3. 3. Conservation des levures.....	47
Etudes des caractéristiques culturelles.....	47
I.3.1 Observation macroscopique.....	47
I.4. Observation microscopique	48
I.4.3. Test de catalase	48
I.4.4. Cinétique de la croissance.....	49
I.5. Caractérisation biotechnologique des souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	50

I.6. Les Test biochimique.....	52
I.6.1. Test Fehling.....	52
PARTIE V RESULTATS ET	58
PARTIE VI DISCUSSION.....	58
I.1. Résultats et discussion	59
./1.1.1 Isolement des levures.....	59
I.1.2. Identification Microbiologique des isolats de levures	59
I.1.3. Résultat de teste catalase :.....	61
I.1.4. Résultat de la cinétique d'une croissance :.....	61
I.1.5. Identification Biotechnologique des souches de S.C.....	62
I.1.6. Interprétation de résultats test du Fehling :.....	64
I.1.7. Résultat de centrifugation	65
I.1.8. Résultat de séchage.....	66
I.2. Discussion générale :.....	67
PARTIE VII CONCLUSION ET PERSPECTIVES	70
PARTIE VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	73

PARTIE II INTRODUCTION

I.1. Introduction

Les levures sont naturellement présentes sur les sols, les surfaces végétales, en particulier les baies de raisin, ou dans les zones viticoles (Ocón, et al., 2010; Bokulich et al., 2013). Leur diffusion est assurée par le vent, les insectes et les humains à travers leurs diverses interventions sur l'environnement (Ganter, 2006; Barata et al., 2012). La microflore des raisins est composée d'une grande variété de micro-organismes répartie entre levures, bactéries et moisissures. Leur présence et leur nombre à la surface des raisins sont influencés par plusieurs facteurs tels que le cépage, les conditions climatiques lors de la maturation, le sol, les pratiques culturales, la localisation géographique du vignoble et l'âge de la vigne (Filoftea, 2010).

À la vigne, les populations de levures sont faibles et sont concurrencées par les moisissures. Très peu de levures fermentaires de type *Saccharomyces cerevisiae* sont retrouvées sur la cuticule des raisins, la plupart des espèces qui s'y trouvent sont oxydatives, c'est à dire qu'elles ne transforment pas, ou très peu, les sucres contenus dans le raisin en alcool. Cette microflore levurienne varie de manière importante d'une parcelle à l'autre en relation probable avec les pratiques culturales et la climatologie du millésime. Par ailleurs, dans le moût en fermentation, les levures issues du raisin ne sont pas systématiquement retrouvées, les espèces significativement présentes sont en nombre limité. Globalement, on rencontre essentiellement des levures à métabolisme strictement oxydatif, appartenant au genre *Rhodotorula*, et quelques espèces fermentaires tel que les espèces apiculées (*Kloeckera apiculata* et *Hanseniaspora uvarum*), on rencontre aussi *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida famata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans* (Ribéreau et al., 1998).

Jusqu'à une vingtaine d'années environ, les méthodes traditionnelles d'identification des levures étaient fondées sur les phénotypes des différents individus. Les levures étaient différenciées en se basant sur les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives ou du stade sexuel, puis sur leurs propriétés physiologiques. Vu le polymorphisme des levures

d'un stade à un autre, dépendant surtout des conditions environnantes, les tests phénotypiques seraient alors limités et imprécis pour leur identification. La mise en œuvre des techniques issues de la biologie moléculaire permet l'identification génétique fine des levures et leur classification selon le genre et de l'espèce sans ambiguïté (Claude et al., 2007).

Les levures sont des acteurs essentiels intervenant dans divers domaines et l'intérêt qu'elles suscitent aujourd'hui est dû à leur grande diversité. Un grand nombre de levures communément utilisées en biotechnologie a été obtenu à partir d'habitats naturels où elles ont développé une faculté d'adaptation à un grand nombre de niches écologiques grâce à leurs propriétés physiologiques très caractéristiques. Par ailleurs, de nombreuses espèces de levures produisent un métabolite primaire très important à savoir l'éthanol, utilisé à la fois comme breuvage, carburant ou à d'autres fins industrielles. Une deuxième contribution majeure des levures dans les progrès de l'humanité a été leur utilité dans l'élucidation des processus biochimiques et génétiques fondamentaux chez les cellules. Ces micro-organismes ouvrent des voies de recherche pour l'avenir. Constamment améliorés, les systèmes de production permettent d'envisager la production de protéines très diverses, pour la pharmacie humaine ou vétérinaire, mais aussi pour d'autres applications dans les domaines de l'agro-alimentaire ou de la dépollution. À l'heure actuelle, seule *Saccharomyces cerevisiae* et ses espèces apparentées ont une importance industrielle majeure. Différents micro-organismes possèdent de bonnes performances de production d'éthanol en métabolisant des hexoses, parmi eux les souches de levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Kluyveromyces marxianus*. La fermentation alcoolique du glucose par *Saccharomyces cerevisiae* est largement connue et maîtrisée et les performances atteintes sont les meilleures (Ogier et al. 1999; Alfenore et al. 2002).

De plus, le fait que cette levure soit un organisme modèle en biologie (métabolisme connu, nombreux outils) (Goffeau et al. 1996) en fait une bonne candidate pour la production industrielle intensive d'éthanol.

PARTIE III SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 01 CHAPITRE I: données sur *saccharomyces cerevisiae*

I.2. Données sur *Saccharomyces cerevisiae*

I.2.1. Définition

Saccharomyces cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie « sucre », myces « < champignon », tandis que *cerevisiae* fait référence à « cerveise », c'est un terme scientifique, nom qu'on donnait autrefois à la bière, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation. Elle est littéralement connue comme levure du sucre (Larpent et Gourgoud, 1985). La levure est utilisée depuis des siècles pour la transformation du sucre en alcool, pour l'élaboration de pain, de vin, de bière. Elle a été découverte, isolée et identifiée au milieu du XIX^{ème} siècle. Ce champignon (mycète d'où -myces), capable de métaboliser des sucres (saccharo-) responsable de la fermentation fut appelé *Saccharomyces cerevisiae* par Meyen en 1837 (Thuriaux, 2004).

I.2.2. Classification

La place de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la classification des êtres vivants est brièvement rappelée au (Tableau No 01).

Tableau 1 : Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Larpent, 1992).

Règne	Protistes-Eucaryotes
Classe	Asomycètes
Sous-classe	Hemiascomycetes
Ordre	Endomycetales
Famille	Saccharomycetaceae
Sous-famille	Saccharomycetoideae
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

I.2.3. Morphologie

S. cerevisiae est une cellule sphérique, ovoïde, ou allongée de taille très variable (3-10 μm , 4-14 μm). Certaines cellules sont cylindriques et de grandes tailles jusqu'à 20 μm de longueur ou plus (Goffeau et al., 1996).

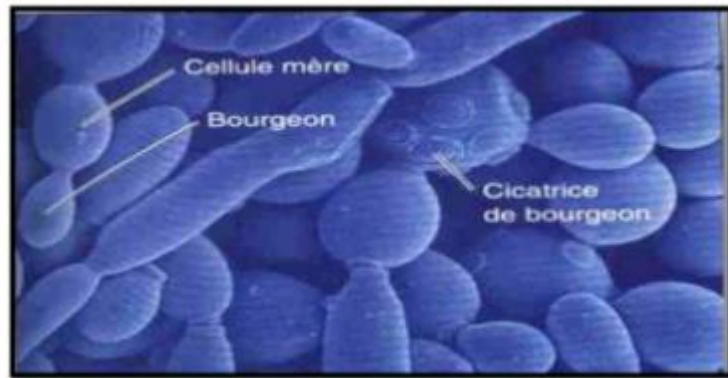


Figure 1 : Micrographie de *S. cerevisiae* (Tortora et Anagnostakos, 1987)

I.2.4. Reproduction

C'est une espèce de levure de bourgeonnement, les principales étapes de bourgeonnement de la levure de *S. cerevisiae* sont représentés dans la (Figure No 10). La souche *S. cerevisiae* capable de bourgeonner une trentaine de fois avant de mourir, et la paroi conserve toutes les cicatrices laissées par les cellules filles (Bourgeois et al., 1998).

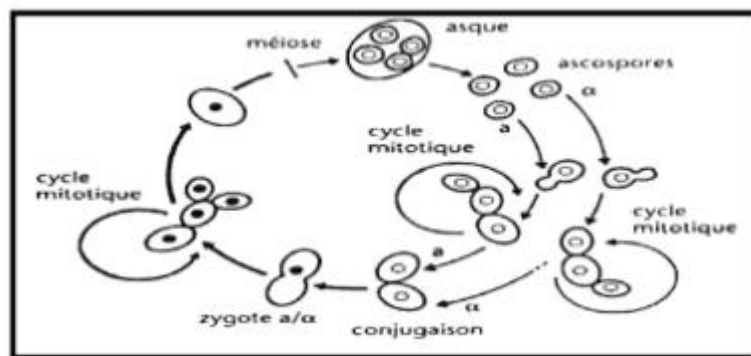


Figure 2 : Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae* (Bourgeois et Larpent, 1996).

I.2.5. Conditions de culture de la levure *S. cerevisiae*

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement (Bouix et Leveau, 1999).

I.2.5.1. Exigences culturelles

- **Le pH** : *S. cerevisiae* présente l'avantage de croître sur un milieu acide, pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un pH compris entre 4- 4,5 (Larpent et Gourgoud, 1985).
- **La température** : la température de croissance est variable suivant les espèces de levures. La température convenable pour la levure *S. cerevisiae* est entre 25°C et 35°C, ce sont des mésophiles (Larpent et Gourgoud, 1985).
- **La pression osmotique** : la levure *S. cerevisiae* est une espèce osmophile qui développe sur des milieux à forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme lent au contraire de certaines espèces (Larpent et Gourgoud, 1985).

I.2.5.2. Besoins nutritionnels

Le milieu de culture doit apporter tous les éléments nécessaires aux systèmes cellulaires et aux besoins énergétiques de la levure.

- **L'eau** : représente 75% du poids total cellulaire. Elle doit être en grande quantité dans le milieu.
- **Le carbone** : la souche *S. cerevisiae* utilise les glucides simples (hexoses) et des disaccharides mais elle est incapable d'utiliser les pentoses.
- **L'azote** : toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions d'ammonium, et l'urée pour constituer des protéines acides nucléiques et des vitamines. (Larpent, 1992).

I.2.5.3. Principales applications de *S. cerevisiae*

Les levures représentent certainement le groupe le plus important de micro- organismes exploités par l'homme. Depuis la plus haute antiquité, elles ont joué un rôle de premier ordre dans l'alimentation humaine : vinification, panification, brasserie, fromagerie.

Tableau 2 : Les principales applications de *S. cerevisiae* (Camonis, 1990).

Produits de <i>S.cerevisiae</i>	Applications
Alcool et CO₂	Fabrication du pain, du vin, de la bière
Ethanol	Solvant
Glycèrol	Chimie des matières plastiques industrie pharmaceutique
Protéine alimentaires (à partir des mèlasses et divers déchets alimentaires)	Alimentation de l'homme ou du bétail
Invetase	Confiserie

I.3. Etude fondamentale des levures

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisés par l'homme depuis les millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation. Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leewenhoek en 1680 qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1866-1876) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence (Bouix et Leveau, 1991). Á la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Buchner. Á l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes (Pol, 1996).

I.3.1. Caractéristiques microbiologiques des levures

Le terme levure provient du mot latin «<levare » qui se traduit par le verbe <<< lever » comme levain (Oteng-Gyang, 1984), rappelle l'attitude de certaines d'entre elles à provoquer la « levée » des pâtes panifiables (Bouchet et al., 2005). Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons unicellulaires ; certaines font des bourgeons qui ne se détachent pas, il se forme alors une courte chaîne de cellules appelée hyphe (Tortora et al., 2003). Ces structures sont immobiles (Guiraud, 2003).

I.3.1.1. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires, largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (les pommes, les raisins) (Bouix et Leveau, 1991). On trouve également des levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol. Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans les conditions défavorables.

I.3.1.2. Morphologie

Les cellules sont généralement ovoïdes. La forme levure est le plus simple des appareils végétatifs. Il se présente sous forme de cellule unique libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir : sphérique, ovoïde, cylindrique, apicule, en bouteille, pyramidale. Sous cette forme unicellulaire les dimensions sont de 2,5 à 10,5µm de large et de 4,5 à 21µm de long. Les dimensions et aspects dépendent fréquemment des conditions de culture et de l'âge des cellules (Larpent, 1991). Certaines peuvent formées des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à certains stades de leur vie (Bouix et Leveau, 1991).

I.3.1.3. Cytologie

Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote (FigureNo 02); le cytoplasme des cellules de levure contient les organites habituels des organismes végétaux supérieurs non photosynthétiques. La cellule est protégée par une paroi rigide (Bouix et Leveau, 1991).

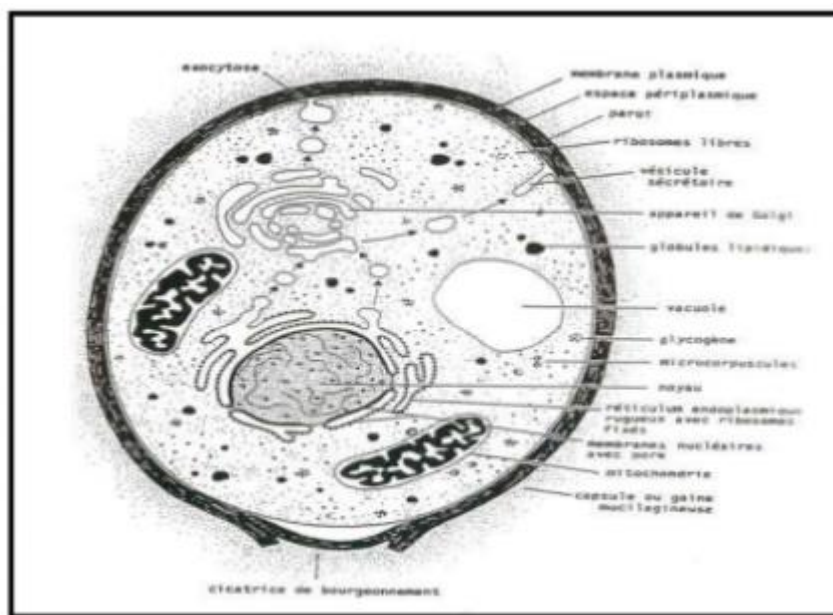


Figure 3 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure (Thuriaux, 2004).

1.3.1.4. La paroi cellulaire

D'une épaisseur de 150 à 230 nm, la paroi englobe toute la cellule. Par sa rigidité elle confère à la levure une forme caractéristique (Bourgeois et Larpent, 1996); c'est un exosquelette qui représente 15 à 20% de la masse cellulaire (Larpent, 1991). Elle est également le siège de molécules déterminant certaines interactions cellulaires comme le facteur killer. Nombreuses enzymes, généralement des hydrolases, sont associées à la paroi ou logées dans l'espace pérplasmique. Elle est formée de deux constituants principaux : les β glucanes et les monoprotéines en plus la chitine (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

1.3.2. La membrane plasmique (ou le plasmalemme)

Sous la paroi, se trouve une membrane simple et fragile qui retient l'ensemble des composants intracellulaires. Elle résiste à pH acide mais elle est altérée par les pH alcalins. Elle est constituée d'une double couche lipidique (les phospholipides et stérols ou « <l'ergostérol »). Dans cette double couche sont localisées des protéines (intrinsèque et extrinsèque) de nature glycoprotéines (Larpent, 1991). C'est une barrière hydrophobe (grâce à ses

phospholipides et stérols) hautement sélective contrôlant les échanges entre la cellule vivante et son milieu extérieur (Ribéreau - Gayon et al., 1998).

I.3.3. Le cytoplasme et ses organites

I.3.3.1. Le cytosol

Une solution tamponnée à pH 5 à 6 contenant des enzymes solubles, du glycogène et des ribosomes (Ribéreau -Gayon et al., 1998).

I.3.4. Le réticulum endoplasmique (RE), l'appareil de Golgi et les vacuoles

Le RE est un système de double membrane quadrillant le cytoplasme, il est relié à la membrane cytoplasmique et à la membrane nucléaire dont il est en quelque sorte une extension. Quoique moins développé chez la levure que chez les cellules exocrines des eucaryotes supérieurs. L'appareil de Golgi; sorte d'empilement de sacs membranaires et de vésicules associées ; c'est un prolongement du RE (Ribéreau - Gayon et al., 1998). Le nombre de vacuoles et leur taille en fonction de l'âge des cellules. Peu de temps avant la naissance d'un nouveau bourgeon, une grande vacuole se fragmente en de multiples (Larpent, 1991). Elle est un lieu de stockage de certaines hydrolases et de métabolites en attente d'utilisation (Ribéreau -Gayon et al., 1998).

I.3.4.1. Les mitochondries

Lorsque les levures se développent en aérobiose, elles possèdent de 30 à 50 mitochondries bien développées dans lesquelles la membrane interne forme de nombreux replis en crêtes. En anaérobiose, ces organismes dégénèrent, leur surface interne décroît, les crêtes disparaissent (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997).

I.3.4.2. Le noyau

Sphérique de 1 à 2 μm de diamètre. L'enveloppe nucléaire, formée d'une double membrane reliée au RE, comporte de nombreux pores, permettant les échanges des petites protéines entre le noyau et le cytoplasme (Ribéreau - Gayon et al., 1998). Il existe dans le noyau des chromosomes linéaires (varie

entre 3 à 16 chromosomes selon les espèces), et des petites molécules d'ADN circulaire (50 à 100 copies), les plasmides 2 μ m (6000 pb) (Bourgeois et Leveau, 1991 ; Ribéreau-Gayon et al., 1998).

I.3.5. Reproduction

On appelle levures Sporogènes celles qui se reproduisent soit de façon sexuée, soit de façon asexuée, suivant les conditions de milieu, et levures Asporogènes, celles se reproduisent uniquement de façon asexuée (Pierre, 2004).

I.3.5.1. Reproduction asexuée

Suivant l'espèce de la levure, cette multiplication végétative se réalise par bourgeonnement ou par scission.

I.3.5.1.1. Reproduction asexuée par bourgeonnement

Le noyau de la cellule se déplace vers la paroi, s'étire et se divise en donnant naissance à un petit bourgeon à la surface de la cellule. Celui-ci croît rapidement pour donner naissance à une cellule fille qui peut ou non se détacher de la cellule mère et bourgeonner à son tour. C'est le mode de reproduction de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

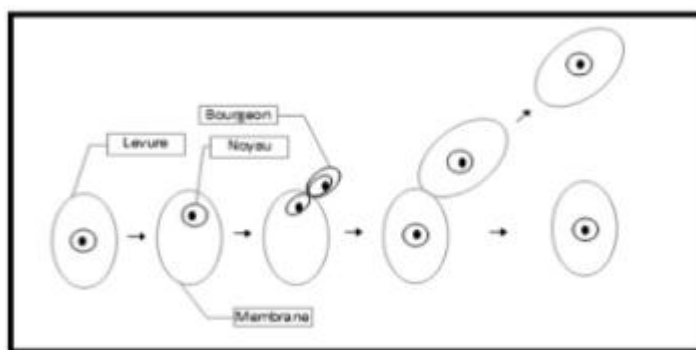


Figure 4 : Schéma de la reproduction asexuée par bourgeonnement d'une levure (Thuriaux, 2004).

1.3.5.1.2. Reproduction asexuée, par scission-Scissiparité

Le noyau s'étire et se casse en deux. Pendant ce temps, une séparation s'amorce au niveau de la paroi, ce qui conduit à la formation de deux cellules. Les levures du genre *Schizosaccharomyces* se reproduisent ainsi.

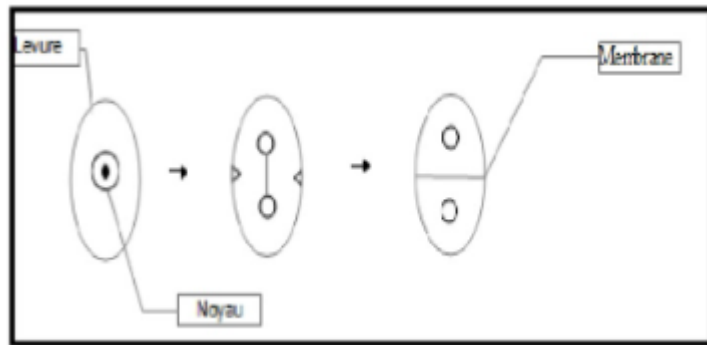


Figure 5 : Schéma de la reproduction asexuée par scission d'une levure (Thuriaux, 2004).

1.3.5.2. Reproduction sexuée

Lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables (température extrêmes, absence d'éléments nutritifs ...), la levure cesse de se multiplier. Elle produit alors des ascospores. Le noyau subit deux divisions successives, chacun des noyaux fils s'entoure de cytoplasme et la levure mère devient un asque. Elle renferme 2 à 4 ascospores qui sont à l'état de vie ralentie et qui ne reprendront leur vie active que lorsque les conditions de milieu seront favorables. Les ascospores représentent le mode de survie durant la mauvaise saison.

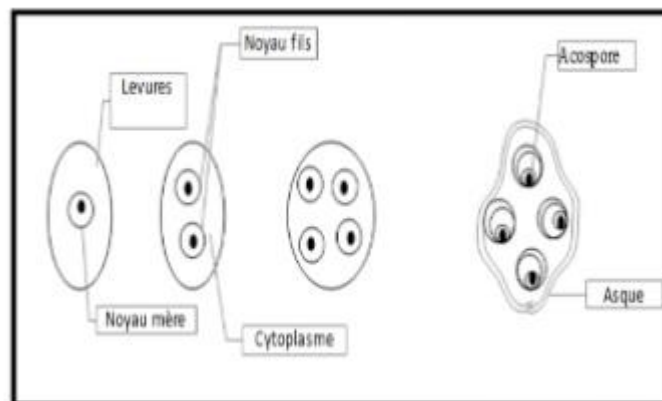


Figure 6 : Schéma de la reproduction sexuée d'une levure (Thuriaux, 2004)

I.4. Différenciation des levures

Les levures sont rattachées aux champignons Ascomycètes, Basidiomycètes et aux champignons imparfaits : les Deutéromycètes. Elles sont réparties en 81 genres auxquels sont rattachées 590 espèces. Longtemps, seuls des caractères botaniques, morphologiques et biochimiques ont permis les différencier et les classer. Cependant, l'isolement et la culture de micro-organismes font appel à des techniques de laboratoire pouvant entraîner des modifications de comportement des espèces, notamment l'aptitude à sporuler. Aujourd'hui, les méthodes d'investigation de la structure moléculaire sont des moyens précis d'identification des êtres vivants (Ribereau-Gayon et al., 1998).

I.4.1. Caractères botaniques

Ils permettent de distinguer :

- Les levures sporogènes, qui rassemblent de nombreux genres : *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*...
- Les levures asporogènes, qui rassemblent les genres *Rhodotorula*, *Kloeckera*, *Candida*, *Brettanomyces*... (Ribereau-Gayon et al., 1998).

I.4.2. Caractères morphologiques

Ils permettent de différencier les levures d'après :

- La cellule par sa forme et ses dimensions ; certaines sont apiculées c'est-à-dire en forme de citron (*Kloeckera apiculata*), d'autres ovoïdes (*Saccharomyces cerevisiae*), d'autres rondes ou bien allongées.
- Le groupe de cellules** ; les unes forment des voiles (muqueux, en anneau); d'autres donnent des dépôts (Ribereau-Gayon et al., 1998).

I.4.3. Caractères biochimiques

Ils permettent de diagnostiquer les espèces de levures par des tests physiologiques menés en laboratoire, en déterminant notamment :

-Les sucres qu'elles peuvent fermenter : glucose, fructose pour les unes, galactose pour les autres.

-Leur rendement en éthanol ; ainsi pour produire 1% volumique, il faut 21 à 22 g de sucre à l'espèce *Kloeckera apiculata* et seulement 16 à 18g à *Saccharomyces cerevisiae*.

-Leur pouvoir alcoogène, c'est-à-dire le TAV maximum pouvant être obtenu avec la levure considérée. L'activité fermentaire de *Kloeckera apiculata* cesse que le moût atteigne 5% d'éthanol ; en revanche *Saccharomyces cerevisiae* peut faire fermenter un milieu jusqu'à qu'il contienne 17% d'éthanol et plus.

I.4.4. Caractères moléculaires

La comparaison et l'estimation de similitudes de génomes rendue possible par l'hybridation et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur l'ADN permettent d'identifier et de classer les êtres vivants, même si leurs résultats prennent parfois en défauts les classifications préexistantes (Maftah et Julien, 1999).

I.4.5. Classification des levures

La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons. Elle est basée au moins au départ sur des caractères morphologiques mais fait intervenir de nombreux caractères biochimiques (Guiraud, 2003). La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente de Lodder (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991).

I.4.5.1. Les ascomycètes

Se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.

I.4.5.2. Les basidiomycètes

Réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.

I.4.5.3. Les deutéromycètes

Regroupent l'ensemble des levures ne présentent pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

I.4.6. Physiologie et croissance des levures

I.4.6.1. Les besoins nutritifs

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans un milieu externe les éléments nécessaires à la synthèse cellulaire et des conditions physicochimiques favorables.

I.4.6.2. L'alimentation carbonée

En somme un taux de sucre élevé gêne la croissance levurienne et diminue la population maximale; en conséquence, la fermentation est ralentie (Ribéreau-Gayon et al., 1998). Les sucres carbonés sont d'une grande importance pour la biosynthèse des constituants cellulaires variés (les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques), leur oxydation fournit l'énergie à la cellule (Larpent, 1991). Certaines levures peuvent utiliser une large gamme de substrats carbonés, mais d'autres assimilent seulement un petit nombre de composés (Bourgeois et Leveau, 1991). Les sources les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (Pol, 1996).

Tableau 3 : Les sources de carbone pouvant être utilisées par les levures (modifié de: Walker et White, 2005).

Sources de carbone	Exemples
Hexoses	D-glucose, D-galactose, D-fructose, D-mannose
Disaccharides	maltose, saccharose, lactose, tréhalose, mélébiose, cellobiose, mélézitose
Trisaccharides	raffinose, maltotriose
Polysaccharides	inuline, cellulose, hemicellulose, chitine
Oligosaccharides	maltotetraose, maltodextrines
Pentoses	L-arabinose, D-xylose, D-xylulose, L-rhamnose
Alcools	méthanol, éthanol, glycérol
Acides organiques	acétate, citrate, lactate, malate, pyruvate, succinate

I.4.6.3. L'alimentation azotée

La synthèse des composés azotés structuraux et fonctionnels de la cellule, dépend de l'assimilation des formes oxydées ou réduites car les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre. Par ailleurs, l'assimilation des ions d'ammoniums est largement répandue chez ces dernières. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote (les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques (Bouix et Leveau, 1991). Tandis que le moût de raisin est relativement riche en constituants azotés (0,1 à 1g/L d'azote soluble), même s'ils ne représentent qu'environ le quart de l'azote total de la baie ; ils comprennent le cation d'ammonium (3 à 10% de l'azote total), des acides aminés (25 à 30%), des polypeptides (25 à 40%), et des protéines (5 à 10%).

I.4.6.4. Oligoéléments et facteurs de croissance

Les levures ont besoin d'éléments nutritifs pour assurer un développement adéquat. Il s'agit de sels minéraux et d'oligoéléments nécessaires à de très faibles concentrations (Larpent-Gourgau et Sanglier, 1992). Ils agissent en complément des protéines comme activateurs ou stabilisateurs d'enzymes et peuvent stimuler la croissance. Parmi les métaux alcalins indispensables: Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} et Mn^{2+} (Pommier, 2003). Les

vitamines (la biotine, la thiamine et l'acide pantothénique) aussi agissent à faible concentration, sur la multiplication et l'activité cellulaire (comme facteurs de croissance).

I.4.7. Les conditions physicochimiques de croissance

I.4.7.1. L'oxygène

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Certaines levures sont aérobies strictes comme les *Rhodotorula*. Les autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant un métabolisme soit fermentaire (comme les *Saccharomyces*) soit respiratoire (comme les *Candida*, les *Kluyveromyces* ...) (Bouix et Leveau, 1991).

I.4.7.2. La température

La température courante de culture des levures se situe entre 25 et 30°C, pour assurer la croissance adéquate de la plupart des levures. En effet, on trouve des levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles (50°C pour *Candida slooffii*, *Saccharomyces telluris*) (Bourgeois et Larpent, 1996).

I.4.7.3. Le pH

Les levures ont tendance à coloniser des environnements acides (leurs enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H_3O^+ et OH^- et par leurs métaboliques acidifiant encore plus le milieu. Elles donc tolèrent des gammes de pH de 2,4 à 8,6 (Bourgeois et Larpent, 1996).

I.4.7.4. La pression osmotique et l'activité d'eau

La plupart des souches ne peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,90. Généralement, les levures résistent mieux que les bactéries à la pression osmotique, en accumulant des polyols comme osmoprotecteurs (betaine, glycérol). Par conséquent, certaines espèces sont osmophiles mais avec un métabolisme lent. Ces levures sont dites xérotolérants (Bourgeois et Larpent, 1996).

I.4.8. Le métabolisme

Les levures présentent une diversité métabolique dans la façon de production et de consommation de l'énergie à partir de substrats dégradés. Toutes les levures sont capables de dégrader le glucose, le fructose et le mannose en présence d'oxygène, par un métabolisme oxydatif conduisant à la formation de CO₂ et H₂O (Pol, 1996). La voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (Larpent, 1991).

I.4.8.1. Métabolisme oxydatif

Les levures utilisant les sucres simples en présence d'oxygène, par conséquent, leurs métabolismes est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Au cours du métabolisme oxydatif, une partie du glucose métabolisé génère des intermédiaires pour l'élaboration de nouvelles cellules, en consommant l'énergie fournit par la chaîne respiratoire. En plus des sucres simples, certaines levures utilisent d'autres glucides (mono, di ou tri saccharides et des polysaccharides comme l'amidon), mais aussi des alcools, des acides et des alcanes (Marlène, 2006).

I.4.8.2. Métabolisme fermentaire

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂. En plus de ces composés majoritaires, des alcools, des aldéhydes, des esters, des acides sont formés en petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (Guiraud et Rose, 2004).

I.5. Levure Modèle génétique universel

Les levures et en particulier *S. cerevisiae*, sont probablement les organismes eucaryotiques dont la biologie cellulaire est la mieux étudiée (c'est-à-dire que l'on anticipe qu'une partie au moins des systèmes cellulaires fonctionnent de façon similaire chez la levure et chez l'homme et par extension chez tous les eucaryotes). 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 (Larpent, 1991). Ceci est vrai dans une certaine mesure et de nombreux processus biologiques mis en évidence ou étudiés chez la levure se sont révélés en partie conservés chez les mammifères bien qu'avec des niveaux de complexité plus élevés que le trafic intracellulaire, la transmission des signaux extracellulaires, la voie sécrétoire (Thuriaux, 2004).

I.5.1. Levures en biotechnologie

Par métabolisme diversifié, les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie) et dans la production des métabolites mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles et industriels. Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent ainsi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B. La facilité d'approvisionnement, de conservation et de mise en culture de ces microorganismes ainsi que la variété des espèces et des souches disponibles sont des atouts majeurs pour les enseignants et font intervenir les levures dans le domaine de la pédagogie. C'est un organisme modèle, peu encombrant, peu exigeant et peu coûteux. La figure No 06 résume les principales utilisations de la levure qui représente le microorganisme le plus exploité par l'homme.

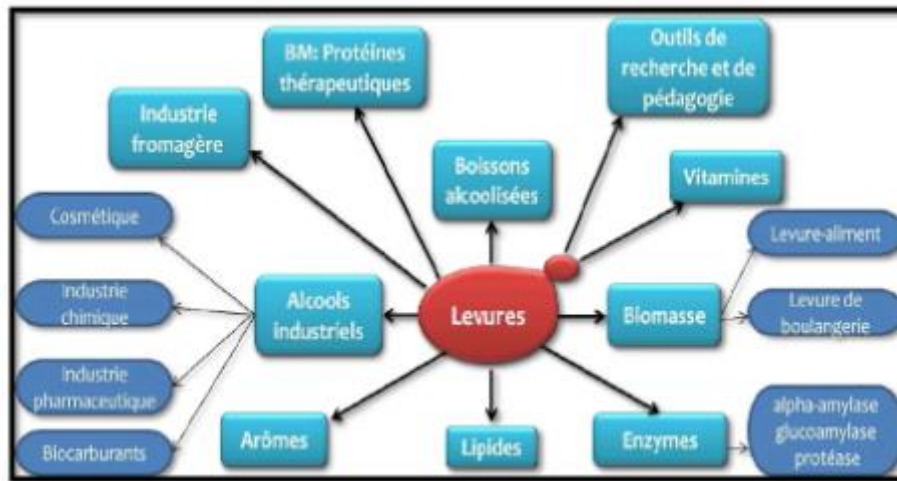


Figure 7 : Schéma des différents domaines d'utilisation des levures (Bourat,1992).

I.5.2. Boissons alcoolisées

Le rôle, le plus ancien des levures est la fabrication de boissons alcoolisées. Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique, qui consiste à transformer les sucres simples en alcool. Ainsi, elles interviennent au cours de la vinification et de l'élaboration de la bière. L'espèce la plus utilisée par l'homme est *Saccharomyces cerevisiae*, appelée aussi levure de bière pour son innocuité (Bouix et Leveau, 1999).

I.5.3. Panification

Une autre utilisation, connue depuis l'antiquité, est la fabrication du pain : Le dégagement de gaz carbonique, qui accompagne la fermentation, permet de faire lever la pâte en lui conférant une texture légère. On utilise également *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie) (COFALEC, 2006).

I.5.4. Affinage des fromages

Les levures sont aussi capables d'utiliser les acides organiques comme source d'énergie et de carbone (Larpent, 1991). Elles participent à l'affinage des fromages ; en consommant l'acide lactique produit par les bactéries lactiques à partir des composants du lait. Elles contribuent aussi à réduire l'acidité du caillé (Bouix et Leveau, 1999). De nombreuses espèces se rencontrent en fromagerie, les plus fréquentes appartenant aux genres :

Kluyveromyces, Debaryomyces, Saccharomyces, Torulopsis, Candida et Rhodotorula (Larpent, 1991).

1.5.5. Production d'alcools industriels

Depuis quelques temps, une nouvelle utilisation des levures est apparue. Les levures, essentiellement des souches du genre Saccharomyces, grâce à leur haute capacité fermentaire, peuvent assurer la bioconversion de nombreux substrats saccharosés (jus de betteraves, sirop, mélasse de sucrerie) en bioéthanol (Bouix et Leveau, 1991).

1.5.6. Autres utilisations

Aujourd'hui, les levures constituent une des importantes sources d'enzymes produites commercialement en raison de leurs capacités polyvalentes et de la frugalité de leurs exigences permettant d'obtenir une biomasse importante à bas prix (Pol, 1996). En effet, l'invertase ou saccharase sécrétée par diverses levures est utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose à partir de mélasses de betterave ou de cannes à sucre (tableau No 02) (COFALEC, 2006).

Tableau 4 Production et utilisation de certaines enzymes levuriennes (COFALEC, 2006).

Type d'enzymes	Levures utilisées	Utilisations
Amylases	<i>Lipomyces starkey</i>	Saccharification de l'amidon
	<i>Schwanniomyces castellii</i>	Boulangerie
		Textile, Papeterie
Invertases	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Confiserie
Lipases	<i>Candida lipolytica</i>	Fromagerie, Laiterie

1.5.7. Avantage des levures en industrie

Par rapport aux bactéries, les levures présentent des éléments favorables quant à leur utilisation en biotechnologie. Elles offrent donc une meilleure résistance que les bactéries à ces conditions de stress, en particulier

la possibilité à des pH acides. En plus, l'état unicellulaire, la capacité à se multiplier rapidement et la rusticité des exigences nutritionnelles à ces eucaryotes permettent de les cultiver, de les étudier et de les utiliser aussi facilement que des micro-organismes procaryotes. Comme l'a écrit James D. Watson, ce sont les « *Escherichia coli* » des eucaryotes (Pol, 1996). Elles produisent des protéines glycolyses qui vont servir à des fins industriels et pharmaceutiques insuline par *Saccharomyces cerevisiae* (Mercier, 1997) et le vaccin de l'hépatite B (Blin, 2002). Leur utilisation dans l'alimentation a fait de sorte que les levures soient globalement plus connues pour leur efficacité en fermentation industrielle que d'autres micro-organismes. Elles ne sont pas attaquées par des virus (phages), elles sont facilement récupérables grâce à leur grosseur. La stabilité génétique des levures permet aussi une très bonne fidélité du procédé et la connaissance de leur physiologie cellulaire facilite leur utilisation (Labrecque, 2003).

Partie 02 CHAPITRE II:

Technologie de la fabrication des levures

I.1. La cellule de levure :

C'est un organisme vivant de la famille des champignons, appelés scientifiquement :

“Saccharomyces cerevisiae”.

Elle se nourrit de sucre et possède la propriété de transformer les sucres naturellement présents dans la farine en dioxyde de carbone et en alcool.

Cette transformation se nomme “fermentation alcoolique”.

Tableau 5 : Composition de la cellule

Composition	
Eau	70 à 75 %
Protéines	12 %
Glucides	13 %
Lipides	1 à 2 %
Matières Minérales	

I.2. Les levures : les micro-organismes les plus cultivés

Elles sont utilisées dans de nombreuses industries :

- **Brasserie** (Bière)
- **Industrie vinicole** (vins & champagne)
- **Industrie des arômes.**
- **Industrie pharmaceutique** (enzymes, vitamines, hormones, vaccins, insuline).

- **Agroalimentaire** (exhausteurs de goût, aliments diététiques enrichis en fer, zinc, chrome sélénium).
- **Alimentation animale** (produits probiotiques).
- **Boulangerie – Viennoiserie**
- **Rôle de la levure en boulangerie**

La levure assure la levée de la pâte par sa production en dioxyde de carbone et donc la légèreté et l'alvéolage du produit fini.

Elle contribue à la formation des arômes du pain, par la production d'alcool.

- **Vie de La levure**

La levure possède la particularité de vivre avec ou sans air :

- **Vie aérobie**

La levure en présence d'air (aérobie) respire, l'énergie utilisée lui permet de se reproduire.

Cette fonction est utilisée dans la fabrication industrielle de la levure.



Figure 8 : reproduction de la levure par bourgeonnement en milieu aérobie

I.3. Schéma de fonctionnement :

La membrane cellulaire fonctionne comme une barrière régulatrice entre le milieu intérieur et le milieu extérieur (*régulateur de la pression osmotique*).

- Action de la membrane cellulaire comme agent régulateur des échanges : substances nutritives, air, alcool, gaz carbonique, eau
- Présence dans le cytoplasme des éléments indispensables : noyau, vacuole (sucs cellulaires), mitochondries (support d'O₂), et enzymes.
- **Présence de trois enzymes dans la cellule de levure, aux pouvoirs complémentaires :**
 - **Maltase** : Transformation du maltose en glucose (dégradation enzymatique de l'amidon de la farine)
 - **Invertase** : Transformation du saccharose en glucose et fructose.
 - **Zymase** : Transformation du glucose et fructose en acide carbonique et alcool.

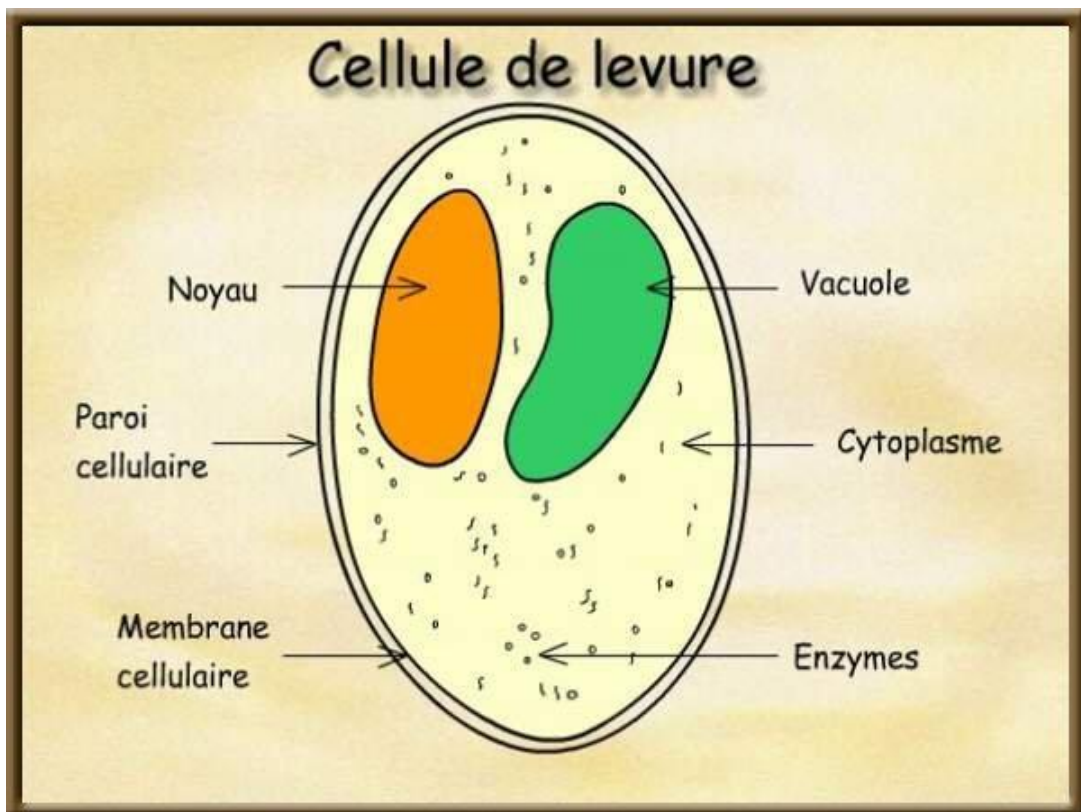


Figure 9 : cellule de levure

- Vie anaérobie

Figure 10 : transformation du maltose par la cellule de levure



En absence d'air (anaérobie), la levure puise son énergie dans la fermentation des sucres.

La zymase de la levure transforme le glucose en dioxyde de carbone et en alcool éthylique, c'est la fermentation alcoolique, génératrice de nombreux arômes présents dans le pain.

A partir de 180 g de glucose la levure va produire 88 g de dioxyde de carbone (soit environ 45 dm³) et 92 g d'alcool.

I.4. Transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu anaérobie :

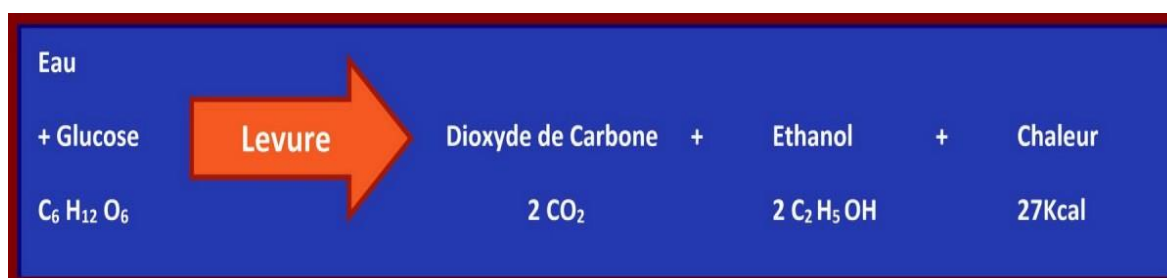


Figure 11 : transformation par la levure d'une mole glucose en milieu anaérobie

I.5. Activité des levures dans les pâtes :

- Au pétrissage : multiplication de la levure en présence de conditions favorables (air, eau, sucres) ; action de la maltase et de l'invertase.
- Au pointage : action de la zymase et gonflement de la pâte (T° idéale : de 20 à 40°C)
- A la cuisson : dégagement exponentiel de gaz carbonique par les levures sous l'action de la T° jusqu'à 50°C, et formation de la structure alvéolée caractéristique.

I.6. Dosage de la levure en panification

La dose de levure pour la panification varie en fonction :

- des techniques de fermentation, (directe ou indirecte)
- des modes de pétrissage,
- des conditions de température et d'hygrométrie environnantes.

Une dose de levure excessivement élevée, ne permet pas de respecter les étapes de la panification. Elle conduit à l'obtention d'un pain, peu savoureux et à un rassissement très rapide.

I.6.1. Doses usuelles

En panification directe.

On admet des doses usuelles et maximales de levure de :

- 20 g à 40 g par litre de coulage,
- 10 g à 24 g par kg de farine soit environ 1 à 2% du poids de farine.

I.6.2. Incorporation de la levure

Elle peut être émietée sur la pâte en début de pétrissage ou délayée dans l'eau de coulage si la température de celle-ci est modérée.

- délayée dans l'eau froide, elle voit son action ralentie,
- délayée dans l'eau chaude (température supérieure à 50°C) elle est détruite,

- délayée dans l'eau tiède (température supérieure à 40°C) elle est affaiblie.

La température optimale pour son action est comprise entre 24 et 30°C.



Figure 12 : représentation activité des levures dans les pâtes

I.7. Qualités d'une levure fraîche : principaux critères

Tableau 6 principaux critères d'une levure fraîche

Moyen de contrôle	Qualités	Défauts
Couleur	Doit être crème clair ou blanche	Ne doit jamais être rougeâtre
Odeur	Doit être inodore	Ne doit pas dégager d'odeur désagréable ou acétique
Goût	Doit avoir une saveur agréable	Ne doit jamais avoir de mauvais goût, ni acidité
Texture	Doit avoir une consistance ferme	Ne doit être en aucune façon molle et gluante
A l'utilisation	Doit se délayer sans former de grumeaux Doit s'émietter facilement lorsqu'on la frotte entre les mains sans coller	

I.8. Présentation commerciale de la levure

La levure est un ingrédient naturel qui ne doit pas être confondu avec « les poudres levantes chimiques » appelées improprement « levure chimique ».

La levure du boulanger « *Saccharomyces cerevisiae* » est cultivée en levurerie dans des cuves contenant de la mélasse de betterave, en milieu fortement oxygéné, en présence d'éléments azotés et minéraux.

I.9. Les différentes formes commerciales

En fonction de besoins commerciaux, la crème de levure est présentée sous formes de :

I.9.1. Levure liquide



- Eau $\approx 80 \%$
- Extrait sec $\approx 20 \%$
- Durée de vie ≈ 3 à 4 semaines
- Température de stockage $\approx 5^{\circ}\text{C}$
- Mise en œuvre : incorporation directe

I.9.2. Levure pressée



- Eau $\approx 69 \%$
- Extrait sec $\approx 31 \%$
- Durée de vie ≈ 4 à 5 semaines
- Température de stockage $\approx 5^{\circ}\text{C}$
- Mise en œuvre : incorporation directe

I.9.3. Levure émiettée



- Eau $\approx 66 \%$
- Extrait sec $\approx 34 \%$
- Durée de vie ≈ 4 à 5 semaines
- Température de stockage $\approx 5^{\circ}\text{C}$
- Mise en œuvre : incorporation directe

I.9.4. Levure sèche à réhydrater



- Eau $\approx 7 \%$
- Extrait sec $\approx 93 \%$
- Durée de vie ≈ 2 ans
- Stockage Température ambiante
- Mise en œuvre : A réhydrater avant incorporation

I.9.5. Levure sèche instantanée



- Eau $\approx 5 \%$
- Extrait sec $\approx 95 \%$
- Durée de vie ≈ 2 ans
- Stockage Température ambiante sous vide
- Mise en œuvre : incorporation directe

I.9.6. Levure à humidité Intermédiaire surgelée



- Eau $\approx 23 \%$
- Extrait sec $\approx 77 \%$
- Durée de vie ≈ 2 ans
- Température de stockage $\approx$ moins 20°C
- Mise en œuvre : incorporation directe

- **Comparaison du pouvoir fermentatif**

Qualité de levure	% de matière sèche	% azote / ms	Pouvoir fermentatif pâte normale (base 100)	Perte après conservation 7 jours / 26°C
Normale	33 %	7.0 %	100	-10 %
Rapide	32 %	7.3 %	110	-25 %
Ultra rapide	31 %	8.2 %	125	-50 %
Haute activité	29 %	9.3 %	165	autolysée
Document «Les pains Français » Philippe Roussel & Hubert Chiron (Poitrenaud 1994)				

I.10. Caractéristiques qualitatives spécifiques

Levure rapide : Elle est apte à consommer plus rapidement le maltose., mais en contrepartie elle est de moins bonne conservation.

Levure osmotolérante : il s'agit d'une levure tolérante à la pression osmotique. La pression osmotique est exercée par le sel et le sucre sur la membrane de la levure, elle conduit à la diffusion des éléments liquides de l'intérieur de la cellule, vers l'extérieur (déshydratation intracellulaire). Ces levures sont utilisées pour des pâtes riches : pains au lait ou brioches.

Levure cryorésistante : Ces levures sont adaptées à la surgélation. Lors de la congélation, la levure subit un phénomène de cryodessiccation. Ici, ce phénomène est retardé en sélectionnant des levures riches en tréhalose (sucre de réserve de la cellule, notamment dans les levures dites lentes), ce qui permet de diminuer l'activité de l'eau.

I.11. Paramètres influençant l'activité de la levure :

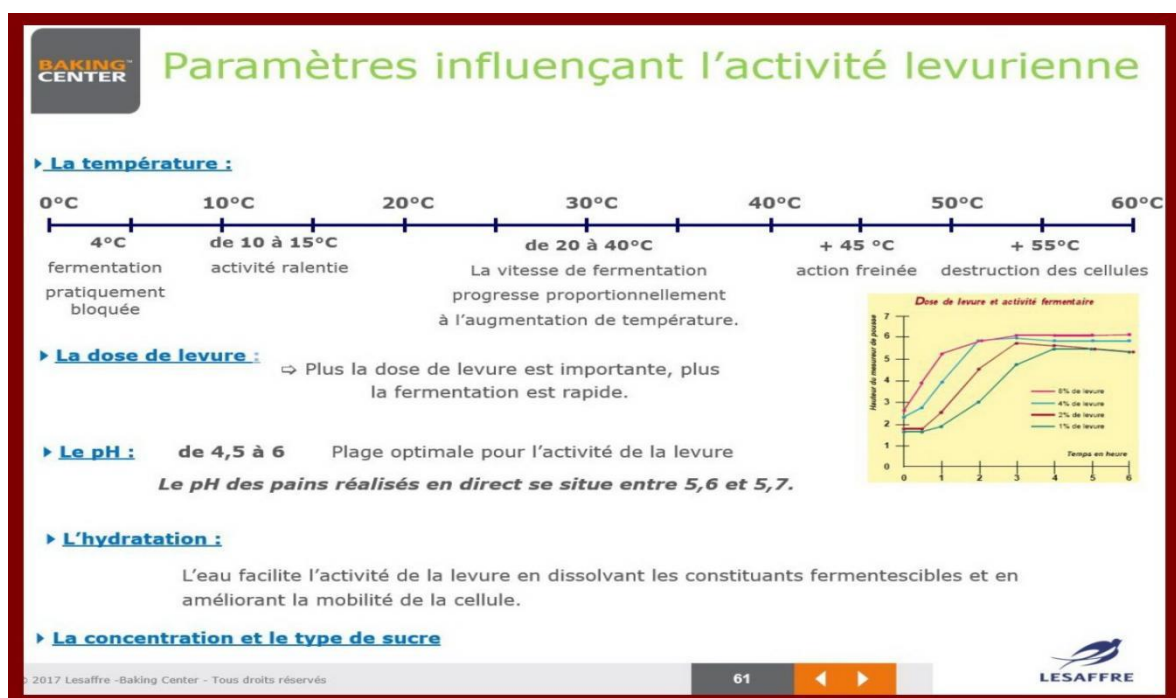


Figure 13 : paramètres influençant l'activité levurienne

I.11.1. Influence de l'hydratation:

L'eau facilite l'activité de la levure, en dissolvant les constituants fermentescibles, et en favorisant l'action des enzymes. La baisse de l'hydratation ou augmentation de la consistance de la pâte ralentit l'activité levurienne.

I.11.2. Influence du pH :

L'acidité optimale pour l'action de la levure se situe entre un pH de 4,5 et 6. Le pH du pain réalisé sur direct se situe vers 5,6 et 5,7.

I.11.3. Influence de la température :

L'augmentation de la température accélère la fermentation. Celle-ci est trois fois plus importante à 30°C qu'à 20°C, dans cette zone de température et jusqu'à 40°C la fermentation augmente de 8 à 10% par degré supplémentaire.

A 0°C l'activité levurienne est quasiment nulle.

A 40°C l'activité de la levure diminue, puis à 50°C elle meurt.

Lorsqu'on recherche le compromis entre vitesse de dégagement gazeux et qualité technologique des pâtes, on considère que la température optimale de fermentation est de 27°C.

I.11.4. Influence de la pression osmotique :

- ***(Pression empêchant un solvant de passer au travers d'une membrane semi-perméable.)***

Le sel et les sucres simples augmentent la pression osmotique, ils modifient l'activité de la levure.

Le sel diminue progressivement l'activité de la levure avec l'augmentation de sa concentration.

Le sucre jusqu'à faible concentration (5%) active la fermentation, mais au-delà de 10% il la réduit, car la pression osmotique se trouve trop forte.

I.11.5. Influence de la concentration en alcool :

L'augmentation de la concentration en alcool, au cours de la fermentation freine progressivement l'activité de la levure.

L'introduction d'alcool dans certaines recettes de brioches, accentue ce phénomène.

I.12. Production industrielle de la levure

Depuis les années 1950 les souches de levures ont été méthodiquement sélectionnées, hybridées afin d'améliorer leur puissance fermentative et leur conservation.

La levurerie utilise les caractéristiques de vie aérobie de la levure pour la production industrielle

Une cellule de levure peut donner naissance à une nouvelle cellule toutes les 20 minutes, ainsi, en 3 jours une seule cellule a produit 17 millions de cellules nouvelles.

I.12.1. Transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu aérobie

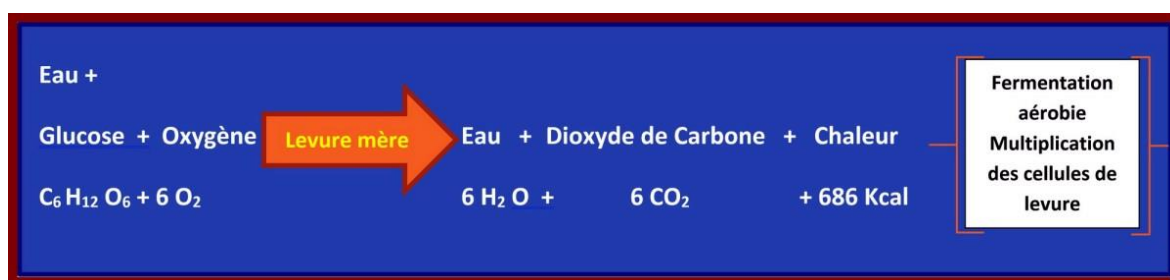


Figure 14 : transformation par la levure d'une mole de glucose en milieu aérobie

Noter que 1 gramme de levure contient environ 10 milliards de cellules vivantes.

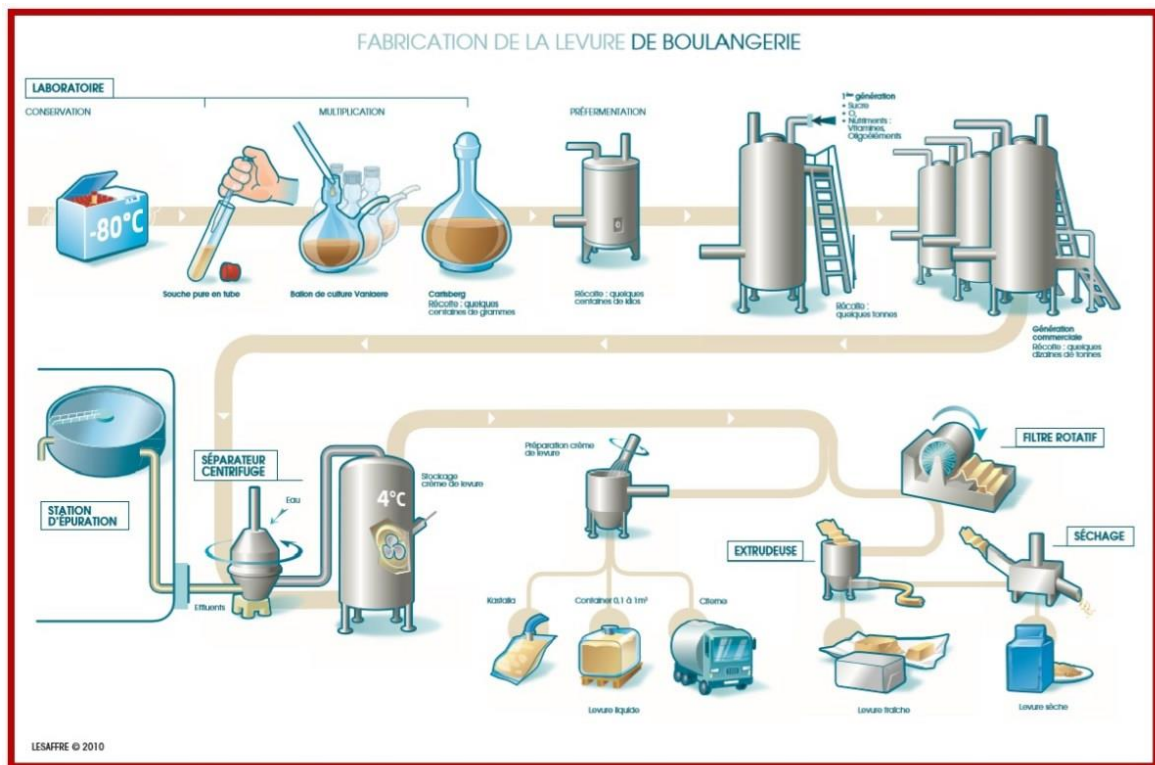


Figure 15 : fabrication de la levure de boulangerie

La levure est produite à l'aide de la mélasse en provenance des sucreries (résidu après cristallisation du sucre), qui lui sert d'aliment de base.

I.12.2. Fabrication de la levure

Lorsque le milieu est favorable, la cellule procède à une multiplication végétative : elle bourgeonne et donne naissance à une cellule fille au patrimoine génétique identique. On estime qu'une cellule peut bourgeonner une vingtaine de fois. Ensuite les cicatrices de bourgeonnement perturbent son métabolisme et elle meurt.

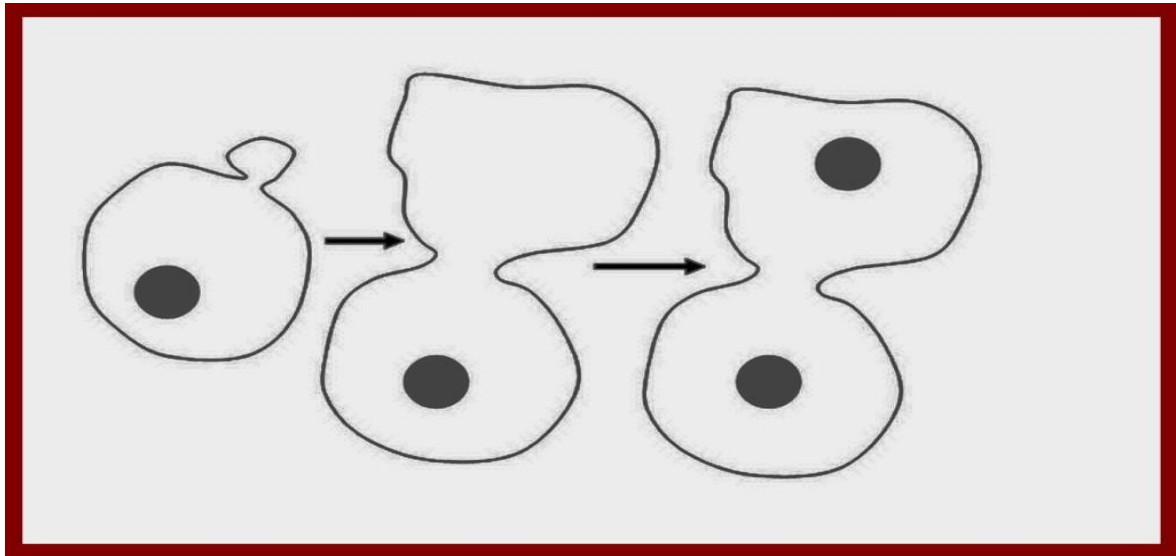


Figure 16 : fabrication de levure boulangère

La levure est produite par une levurerie. On utilise la fermentation aérobie de levure pour en assurer la multiplication. Les matières premières utilisées pour la production de levure sont :

- La mélasse de betterave ou de canne à sucre, un co-produit sirupeux de l'industrie sucrière qui constitue la source principale de sucre, d'oligo-éléments et de vitamines,
- L'ammoniaque et l'acide phosphorique qui apportent l'azote et le phosphore,
- L'air, source d'oxygène nécessaire à la fermentation,
- l'eau.

La production d'une tonne de levure commerciale de levure nécessite 1,5 tonne de mélasse, 7000m³ d'air et 30 m³ d'eau.

- **1^{ère} étape : Fermentations successives pour obtenir la levure-mère**

A partir de la souche pure, est créé l'inoculum, qui propagé dans des cuves de taille croissante, constituera la levure mère.

- **2^e Etape : Fermentation pour l'obtention de la levure commerciale**

Chaque cuve estensemencée par de la levure-mère, avec des apports précis de mélasse, de sels nutritifs et d'air, et des contrôles stricts de température et de pH pour assurer le bon développement et le bon équilibre de la cellule. La fermentation pour production de levure commerciale dure environ 16 heures.

- **3^e Etape : Extraction**

En fin de fermentation, le mélange est de nouveau centrifugé pour séparer la levure des résidus de mélasse. Cette opération peut être répétée plusieurs fois, avec un lavage à l'eau. On obtient alors de la **levure-crème**, qui est refroidie à la température de +4°C.

- **4^e Etape : Déshydratation**

Au sortir des centrifugeuses, la crème de levure contient encore plus de 30 % d'eau extra-cellulaire. Cette eau est éliminée sur un tambour rotatif sous vide.

- **5^e Etape : Conditionnement**

La levure, raclée sur le filtre rotatif, tombe dans une trémie pour y être malaxée (incorporation d'air) et finalement envoyée dans un tube d'extrusion pour former un boudin pâteux continu. En sortie, le boudin est découpé en blocs de 500 g qui sont immédiatement emballés dans du papier alimentaire sulfurisé.

La levure peut être aussi livrée sous forme de Crème de levure à la suite de la 3^e étape. (Voir illustration ci-dessus)

- **Levure biologique (AB)**

Quel que soit le fournisseur retenu, il faudra lui demander un certificat de garantie de production biologique des marchandises livrées en cours de validité, certificat qui vous sera demandé lors des contrôles (voir la rubrique « contrôle et certification ») ainsi que la mention « agriculture biologique » sur facture pour chaque livraison. I

Les levures et produits à base de levures font l'objet d'un règlement d'application particulier (Règlement (CE) n°1254/2008 du 15 décembre 2008) qui a été ajouté au règlement d'application n°889/2008. Les détails ci-dessous s'adressent aux boulangers et aux fabricants de levures de boulangerie.

Les levures et produits à base de levures seront considérés comme des ingrédients d'origine agricole à compter du 31 décembre 2013.

Seuls les substrats produits selon le mode biologique doivent être utilisés pour la production de levures biologiques. Cependant, l'ajout de 5% d'extrait de levure non biologique est autorisé comme substrat additionnel pour la production de levure biologique jusqu'à nouvel ordre.

Les denrées alimentaires produites en boulangerie-pâtisserie ne peuvent pas contenir des levures biologiques et des levures non biologiques.

Les auxiliaires technologiques autorisés pour la production de levures et de produits à base de levures ont été ajoutés à l'annexe VIII partie C.

PARTIE IV MATERIEL ET METHODES

I.1. Technique de prélèvement

Le processus débute par la collecte de grappes de raisin saines. Ces grappes sont soigneusement lavées sous l'eau courante afin d'éliminer toute saleté visible. Une solution saline stérile à 0,9 % est ensuite préparée pour les étapes ultérieures.

I.2. Préparation du milieu de culture (Sabouraud) (YPG)

I.2.1. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Le Sabouraud Dextrose Agar est un milieu de culture solide largement utilisé en microbiologie pour l'isolement et la culture des champignons, en particulier des levures et des moisissures.

La composition du milieu est la suivante :

- **Dextrose (glucose)** : 40 g/L (source de carbone)
- **Peptone** : 10 g/L (source de protéines et d'azote)
- **Agar** : 15 g/L (gélifiant)
- **Eau distillée** : ajustée pour compléter la préparation.

Le pH est maintenu à **6,6**, un niveau optimal pour inhiber la croissance des bactéries.

I.2.2. Milieu YPG / Yeast peptone Glucose

Est un milieu de culture couramment utilisé par la croissance des levures et d'autres champignons.

Les composants de milieu YPG :

- Extrait de levure (10g/l) source de vitamine et de facteur de croissance)
- Peptone (20g/l – source de protéine et acide aminé)
- Glucose (20g/l – source de carbone pour fermentation et respiration)
- Eau distillée 1l
- Gentamicine (1.5)

Méthodes d'isolement de la levure

I.1.3. Méthode I : Fermentation des raisins

Le processus de fermentation commence par la répartition de 15 g de raisins en deux parts égales, placées dans un flacon stérile. Ensuite, 100 ml d'eau physiologique stérile sont ajoutés au flacon, suivis de 15 g de raisins supplémentaires. Le mélange est soigneusement homogénéisé, puis laissé à fermenter pendant une durée de 2 mois.

Après la fermentation, un milieu de culture (YPG enrichi avec de la gentamicine) est préparé dans des boîtes de Pétri, où il est laissé solidifier. Pour l'ensemencement, une anse stérile est utilisée pour transférer une portion du liquide fermenté sur la surface de l'agar solidifié. Les boîtes sont ensuite incubées à une température comprise entre 25 °C et 30 °C pendant 24 à 48 heures pour permettre le développement des colonies de levures.

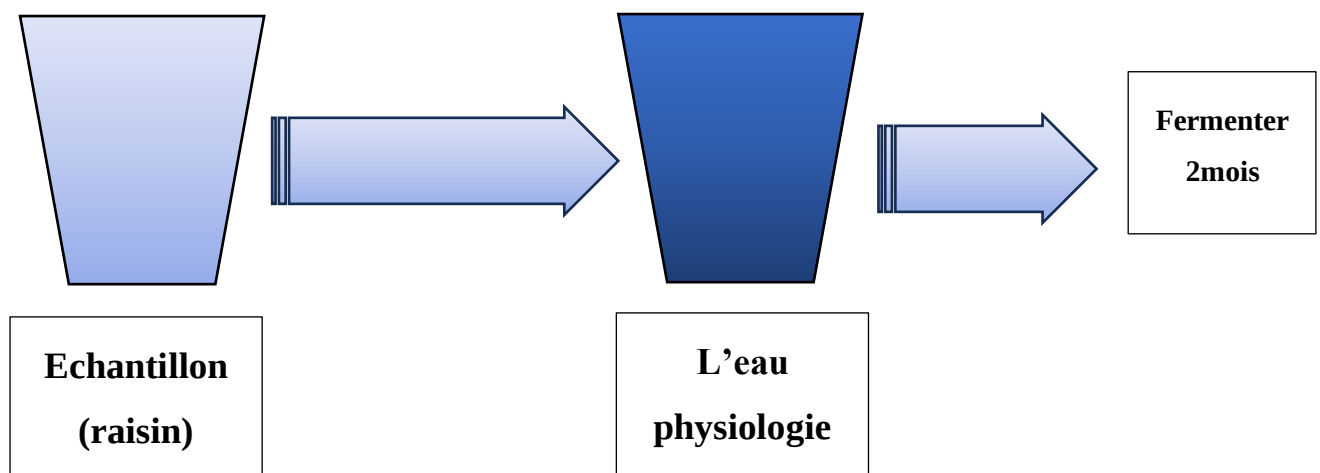
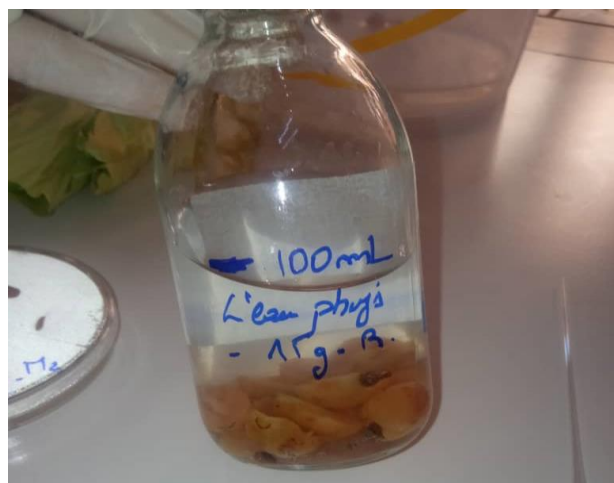


Figure 17 : représentation de fermentation des raisin



I.1.3. Méthode II : Dilution des solutions liquides

Cette méthode repose sur la dilution des solutions liquides obtenues à partir des raisins. Elle commence par l'écrasement délicat des raisins dans un bécher stérile. Ensuite, 10 ml du jus extrait sont transférés dans un flacon contenant 90 ml d'eau distillée stérile pour préparer une solution mère.

À l'aide de pipettes et de micropipettes stériles, des volumes précis sont prélevés pour réaliser des dilutions successives dans des tubes stériles. Les dilutions correspondantes (-1 et -2) sont ensuite utilisées pour ensemercer des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture Sabouraud solidifié.

Enfin, les boîtes sont incubées à une température comprise entre 25 °C et 30 °C pendant 24 à 48 heures, permettant le développement des colonies de levures.

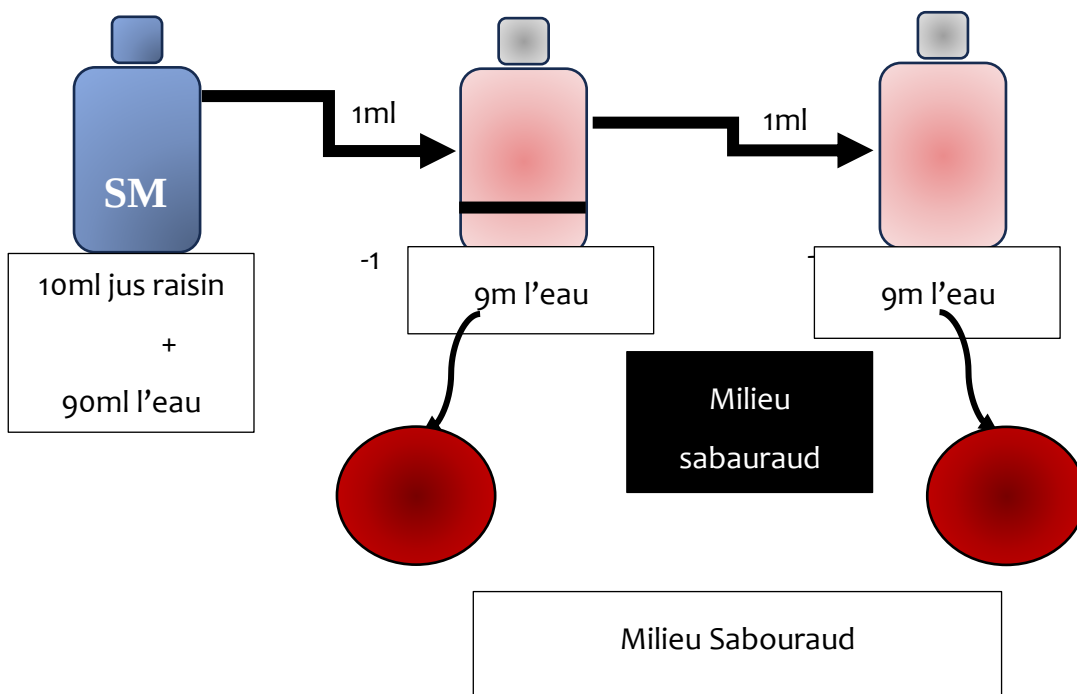
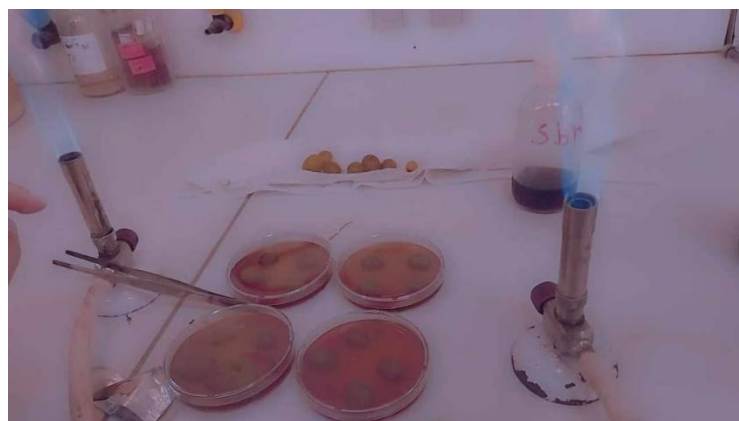
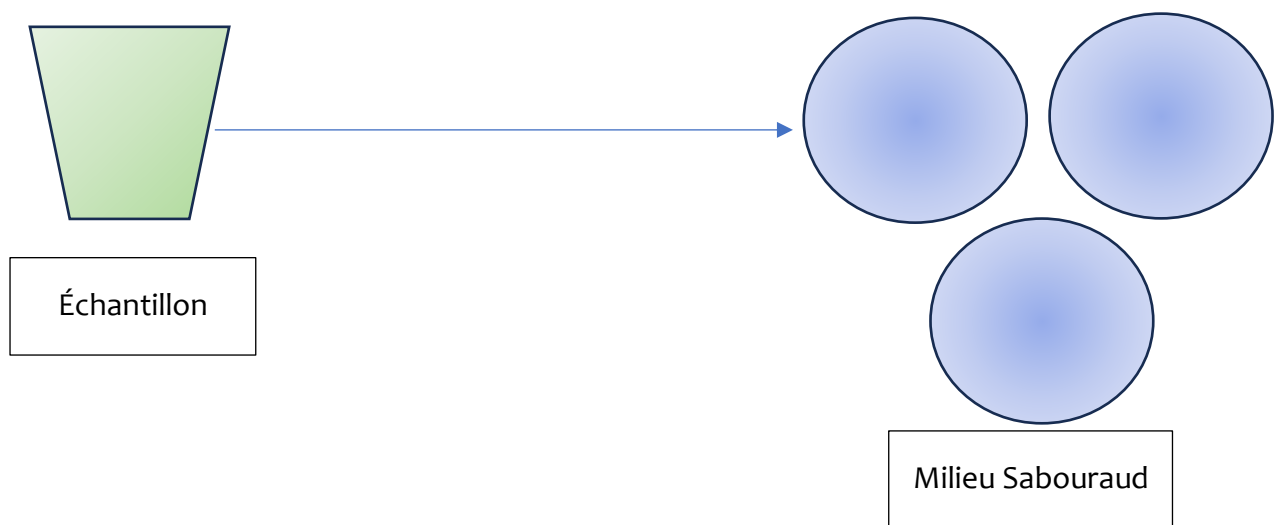


Figure 18 : présentation dilution des solution liquide

I.1.3. Méthode III : Placement des raisins dans des boîtes de Pétri

Cette méthode consiste à diviser les grappes de raisin en parts égales. Ensuite, le milieu de culture Sabouraud est versé dans des boîtes de Pétri et laissé solidifier. Une fois le milieu prêt, les portions de raisins sont placées directement sur la surface de l'agar dans les boîtes de Pétri.

Les boîtes sont ensuite incubées à une température comprise entre 25 °C et 30 °C pendant 24 à 48 heures pour permettre et favoriser la croissance des microorganismes présents sur les raisins.



1. Isolement

L'isolement des souches commence par le prélèvement du jus de raisin ou du moût destiné à la fermentation, à l'aide d'une anse en respectant scrupuleusement les règles de stérilité. L'inoculum est déposé sur une zone périphérique d'environ 1 cm² dans une boîte de Pétri contenant le milieu de culture.

Après avoir flambé et laissé refroidir l'anse, l'inoculum est disséminé en traçant des stries serrées sur la moitié de la boîte. La boîte est ensuite pivotée d'un quart de tour, l'anse est flambée à nouveau, refroidie, et de nouvelles stries sont tracées dans l'autre moitié, en recouvrant partiellement les stries précédentes. Cette opération est répétée pour disséminer l'inoculum dans le troisième et le quatrième quadrant de la boîte.

Les boîtes sont soigneusement codées et organisées, puis incubées en position inversée à 25 °C pendant 48 heures.

2. Purification des levures

La purification des levures est réalisée par une série d'ensemencements en stries sur des boîtes de culture gélosée (YPG enrichi en gentamicine). Cette méthode vise à obtenir des cultures pures en sélectionnant, à chaque itération, une colonie isolée. L'opération est renouvelée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de cultures pures, confirmée par observation microscopique.

I.12.3. 3. Conservation des levures

Pour une conservation prolongée, les souches de levures sont stockées à -18 °C dans leur propre milieu de culture, assurant leur viabilité et leur stabilité sur le long terme.

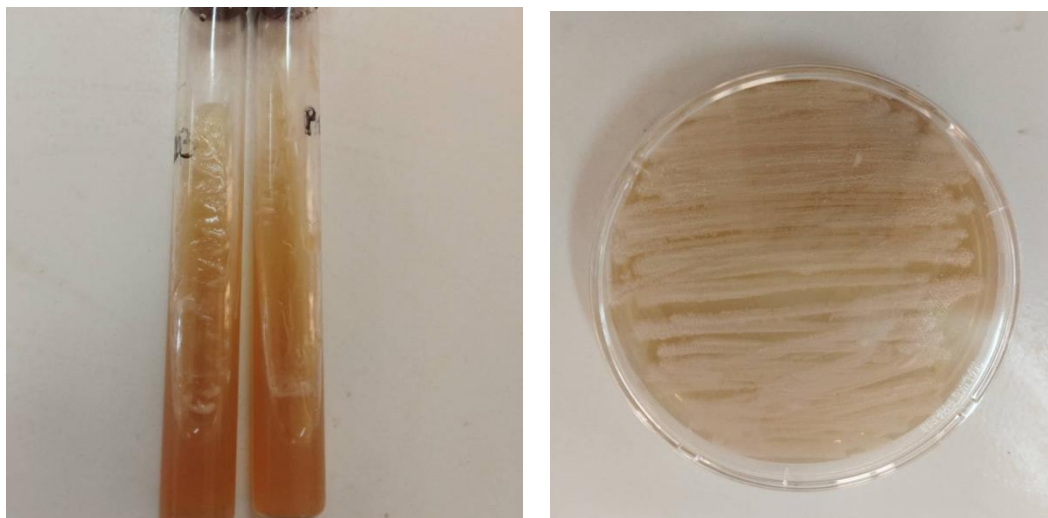


Figure 19 : conservation de la souche

Etudes des caractéristiques culturelles

I.3.1 Observation macroscopique

On Effectuée directement sur boîte de pétri, cette dernière est liée à de nombreux caractères mentionnés dans le tableau No 07 ci-dessous.

Tableau 7 : Ensemble des caractères macroscopiques (Callon, 1997).

La forme	Ronde
Le contour	Régulier ou irrégulier
La taille	Moyenne, Petite, grosse
La surface	Lisse ou rugueuse
La couleur	Blanche ou opaque
Autre caractères	La consistance ou l'odeur

I.4. Observation microscopique

I.4.1. Observation microscopique sans coloration

Cette observation vise à examiner directement la forme microscopique des levures ainsi que le type de bourgeonnement.

I.4.2. Observation microscopique après coloration au bleu de méthylène

Pour une analyse plus détaillée, une coloration spécifique est réalisée. À l'aide d'une spatule stérile, une colonie de levure est prélevée et déposée sur une lame stérile contenant une goutte de solution de bleu de méthylène. La préparation est ensuite recouverte d'une lamelle et immédiatement observée au microscope à l'objectif x40, permettant d'obtenir une meilleure visualisation des formes et types de bourgeonnement des levures.

I.4.3. Test de catalase

Le test de catalase est une méthode couramment utilisée pour détecter la présence de l'enzyme catalase chez les micro-organismes. Cette enzyme décompose le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène, un indicateur important de l'activité enzymatique des levures.

Une petite quantité de *Saccharomyces cerevisiae* (S.C) est prélevée à partir d'une culture fraîche et déposée sur une lame de microscope en formant une petite étoile. Une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 3 % est ensuite ajoutée sur la levure. La réaction est observée immédiatement. La formation de bulles indique que l'enzyme catalase est présente, décomposant le H_2O_2 en eau et en oxygène.

I.4.4. Cinétique de la croissance

I.4.4.1. Culture discontinue

Une culture de *Saccharomyces cerevisiae* (S.C) est inoculée dans un erlenmeyer de 250 ml contenant 300 ml de milieu Sabouraud pour l'ensemencement à partir de raisin (v/v). Une mesure spectrophotométrique à 600 nm est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à usage unique pour déterminer la densité optique.

L'échantillon est ensuite placé dans un bain thermostaté avec agitation afin d'assurer des conditions optimales de croissance.

I.4.5. Paramètres de la fermentation :

- Température : 30 °C
- Agitation : 180 tr/min

Un suivi est effectué toutes les 2 heures pendant 2 jours. À chaque prélèvement, 2 ml de la culture fermentée sont prélevés dans des tubes stériles. La méthode est illustrée dans la figure 22.

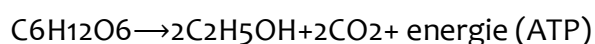


Figure 20 : représentation la cinétique d'une croissance

I.5.Caractérisation biotechnologique des souches de *Saccharomyces cerevisiae*

I.5.1. Fermentation alcoolique

La capacité des souches de *Saccharomyces cerevisiae* à produire de l'éthanol et du CO₂ est un indicateur clé de leur activité fermentaire. La fermentation alcoolique se caractérise par l'assimilation du glucose, suivie de la production de deux principaux produits de fermentation : le dioxyde de carbone (CO₂) et l'éthanol (C₂H₅OH). Cette réaction se déroule en milieu anaérobie (absence d'oxygène), et peut être représentée par la réaction chimique suivante :



Il s'agit d'une oxydation incomplète du glucose, qui libère de l'énergie au cours du processus.

I.12.3.1. I.1.5. Préparation des souches à caractériser

Après la réactivation des souches de *Saccharomyces cerevisiae* conservées dans du glycérol à 25 % (v/v), celles-ci sont cultivées sur la surface du milieu (YPG + gentamicine) pendant 24 heures à 25 °C. À l'issue de cette incubation, la masse levurienne formée est récupérée et pesée pour évaluer son pouvoir fermentaire.

► Équipements, Matériels (Voir Annexe 2).

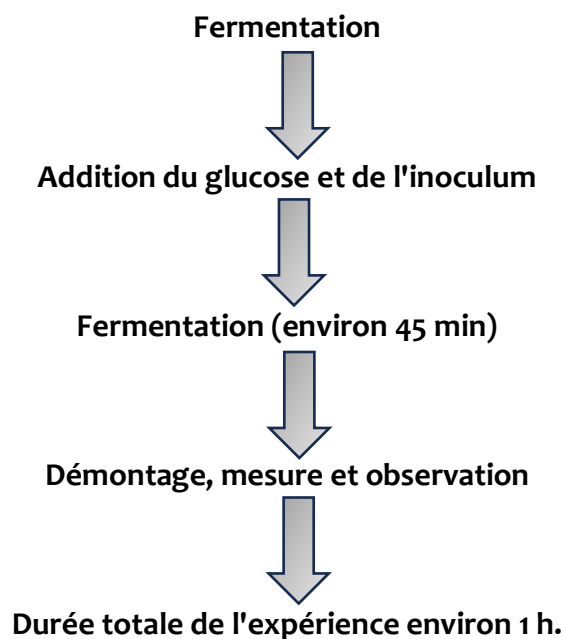




Figure 21 : Dispositif de mesure du CO₂ produit permettant la collecte du gaz (Pol,1996).

Les Méthode :

Etape 1 : Remplir le cristallisoir avec de l'eau à environ la moitié de sa capacité.

Etape 2 : Remplir complètement l'éprouvette de 250 ml avec de l'eau et le boucher hermétiquement avec la paume de la main.

Etape 3: Renverser l'éprouvette en immergeant son ouverture dans le cristallisoir, puis retirer la main et fixer l'éprouvette à la pince.

Etape 4 : Raccorder le tube flexible au connecteur inséré dans le bouchon troué en bois.

Etape 5: Introduire l'autre extrémité du tube flexible dans l'éprouvette remplie d'eau.

Addition de glucose et de l'inoculum

Etape 6: Mettre en suspension 1 g de chaque souche de « *Saccharomyces cerevisiae* » dans 20 ml d'eau distillée dans le ballon en verre.

Etape 7: Mettre le ballon sur un agitateur réglé à 30°C.

Etape 8: Verser 0.8 g de glucose dans le ballon et agiter jusqu'à dissolution complète de sucre.

Etape 9: Boucher hermétiquement le ballon avec le bouchon troué en bois, pour que le gaz produit par fermentation puisse s'échapper à travers le tube flexible et être recueilli dans l'éprouvette.

Étape 10 : Placer l'ampoule à décanter dans le 2ème trou du bouchon et laisser le robinet ouvert pendant 15 min.

Étape 11: Dès que les 15 min sont achevées, fermer le robinet de l'ampoule à décanter.

Étape 12: Durant toute la fermentation, agiter périodiquement la culture en imprimant un mouvement rotatif à l'ampoule à décanter et observer comment le gaz produit s'accumule dans l'éprouvette en y déplaçant l'eau.

Lorsque le volume de gaz dans l'éprouvette restera inchangé pendant au moins 5 minutes, malgré les agitations périodiques, vous saurez que la fermentation est terminée.

I.6. Les Test biochimique

I.6.1. Test Fehling

I.6.1.1. Principe du test de Fehling :

Le test de Fehling repose sur la capacité du sucre réducteurs à réduire les ions Cu^{2+} en milieu alcalin produisant un précipité de Cu_2O (oxyde cuivreux) rouge brun.

I.6.2. Réactifs de Fehling

1- Solution de Fehling A

Sulfate de cuivre (CuSO_4) dissous dans l'eau distillée

2- Solution de Fehling B

Tartrate de potassium et de sodium dissous dans de l'hydroxyde de sodium (NaOH)

Ces solutions doivent être mélangées en quantités égales avant utilisations

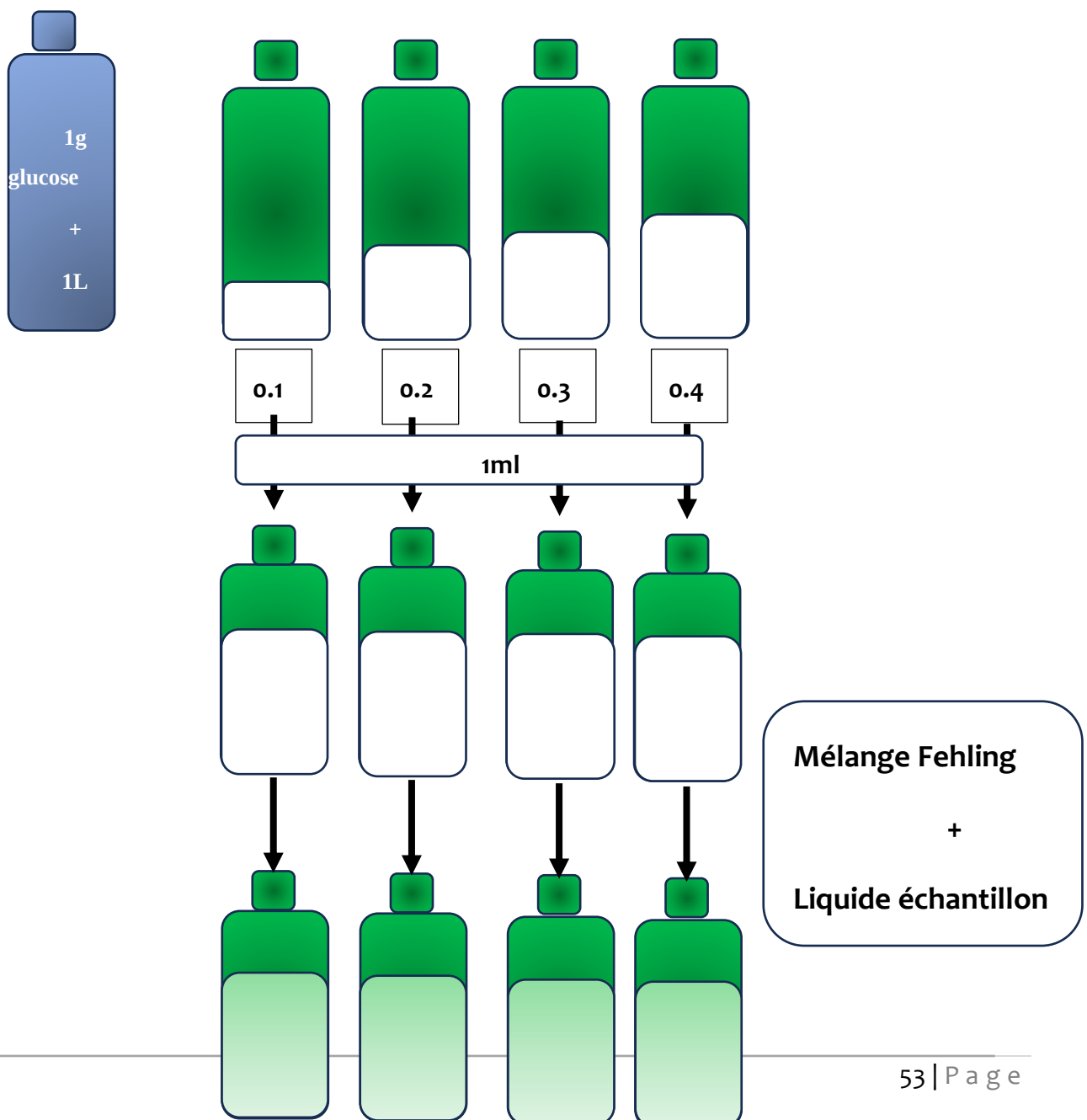
Procédure :

Pour la préparation des cultures, on commence par la cultivation **S.C** dans un milieu Sabouraud ou YPG. Puis on va Prépare le mélange de Fehling en mélangeant à parts égales les solutions A et B. ensuite on Dissolve 1g de glucose dans 100ml d'eau distillée pour obtention une solution mère. Ensuite on répartisse cette solution dans des tubes stériles en différentes concentrations.

Puis on Prépare une gamme de solutions standards de glucose à des concentrations connues. Enfin, on dilue les échantillons selon les besoins.

Et pour les analyses on ajoute un mélange de Fehling a un échantillon du milieu de culture contenant les pro. puis on va Chauffer doucement le mélange au bain mari pendant 5 – 10m, pour permettre la réaction.

0.1	1ml	9ml	10ml
0.2	2ml	8ml	10ml
0.3	3ml	7ml	10ml
0.4	4ml	6ml	10ml



Observation :

- Observation le changement de couleur la fermentation d'un précipité rouge brique d'oxyde de cuivre indique la présence de sucre réducteurs
- Tracer la courbe de clibinition en flottant l'absence contre la concentration de glucose.



Méthode de Centrifugation :

La centrifugation des levures repose sur le même principe général que la centrifugation classique, mais elle est adaptée pour la séparation des cellules de levure (qui sont des cellules eucaryotes unicellulaires) des milieux de culture ou d'autres composants liquides. Voici un aperçu du processus spécifique à la centrifugation des levures

Principe de centrifugation pour la levure :**1. Préparation de l'échantillon :**

Les levures sont cultivées dans un milieu liquide contenant des nutriments essentiels à leur croissance. Une fois la culture de levures prête à être séparée, une aliquote de cette culture est placée dans des tubes de centrifugation.

2. Application de la force centrifuge :

Lors de la centrifugation, les cellules de levure, étant plus denses que le milieu de culture (qui est principalement constitué d'eau et de nutriments dissous), migrent rapidement vers le fond du tube sous l'effet de la force centrifuge. La force exercée dépend de la vitesse de rotation de la centrifugeuse et de la taille/densité des cellules.

**Méthode de Séchage :**

Le séchage des levures, un processus clé dans l'industrie alimentaire et biotechnologique (notamment pour la production de levure boulangère ou de levure utilisée dans les bioprocédés), repose sur le même principe général de réduction de l'humidité, mais il est adapté pour préserver la viabilité des cellules de levure.

1. Objectif du séchage des levures :

Le séchage des levures vise à réduire la teneur en eau tout en maintenant la viabilité des cellules pour qu'elles puissent être réactivées ultérieurement. Il est

crucial que le séchage ne soit pas trop agressif afin de ne pas dégrader les cellules.

2. Mécanisme de séchage pour la levure :

Le séchage de la levure suit généralement une méthode de séchage à l'air chaud ou par atomisation, avec des conditions contrôlées de température, d'humidité, et de flux d'air pour éviter les dommages cellulaires.

a. Séchage par convection (air chaud) :

Principe : La levure est placée dans un flux d'air chaud. L'air réchauffe doucement les cellules et permet l'évaporation de l'eau à partir de leur surface.

Étapes :

Les levures fraîchement récoltées sont d'abord concentrées par centrifugation pour réduire leur teneur en eau initiale.

Ensuite, elles sont séchées à l'aide d'un séchoir à air chaud, où la température doit être soigneusement contrôlée pour ne pas dépasser des seuils qui pourraient tuer les cellules.

La levure perd progressivement son humidité et forme une poudre ou des granules.

Température : Typiquement entre 30°C et 40°C pour éviter de tuer les cellules de levure, la température idéale dépend de l'espèce de levure.

3. Paramètres critiques :

Pour préserver la viabilité des cellules de levure, plusieurs paramètres doivent être strictement contrôlés :

Température : Une température trop élevée détruirait les cellules. Les températures douces (30°C à 40°C) sont souvent utilisées.

Taux d'humidité résiduel : L'humidité finale des levures sèches est généralement réduite à 4-8% pour garantir une bonne conservation tout en maintenant la viabilité.

Durée de séchage : Un séchage trop rapide ou trop lent peut endommager les cellules. Le séchage doit être effectué de manière progressive.

Flux d'air : L'air doit être sec et bien circuler pour évacuer efficacement l'humidité tout en maintenant une température basse.



PARTIE V RESULTATS ET

PARTIE VI DISCUSSION

I.1. Résultats et discussion

I.1.1. Isolement des levures

Les levures sont classées d'après leur forme, leur mode de reproduction, leur possibilité de former un voile, de fermenter les sucres, d'assimiler les nitrates et d'utiliser l'éthanol. L'isolement et la purification par repiquages successifs des levures prélevés.

Isolement des levure *saccaromyces cerevisiae*, la levure sont isolées sur le milieu (YPG + Gentamicine, Sabouraud) l'ensemencement est fait en surface par étalement 0,1ml de culture.

Les boîtes sont ensuite incubées à 25°-30° pendant 3 à 5 jour

I.1.2. Identification Microbiologique des isolats de levures

I.1.2.1. Etude des caractéristiques culturelles

L'examen macroscopique des cultures « levuriennes » après incubation à 25°C pendant 4-5 jours montre des colonies crémeuses (Figure No 24), généralement bien isolées, de couleur blanchâtre, crème ou parfois jaunâtre et à contour irrégulier et opaque. Par ailleurs, les colonies des isolats sont lisses et caractérisées par des tailles moyennes, cependant, certains isolats présentent une odeur de la levure de bière et parfois une odeur intense.



Figure 22 : Observation macroscopique de certains isolats de levures isolés.

I.1.2.2. Etude des caractéristiques cellulaires

L'observation microscopique nous a permis d'authentifier la forme cellulaire des isolats isolés et leurs modes de reproduction végétative. Parmi les isolats, d'entre eux sont sphériques ou cylindriques, de forme allongée ou courte (figure 25), et présentent par ailleurs, différents modes de reproduction végétative (monopolaire, bipolaire et même multipolaire), alors que les isolats restants ils sont caractérisés par des formes ovoïdes et propagent par bourgeonnement monopolaire. L'uniformité des cellules obtenues après isolement confirme la purification parfaite des isolats étudiés. Selon Larpent, (1991), les levures se présentent sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique variée qui peut être sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculé en bouteille ou pyramidale.

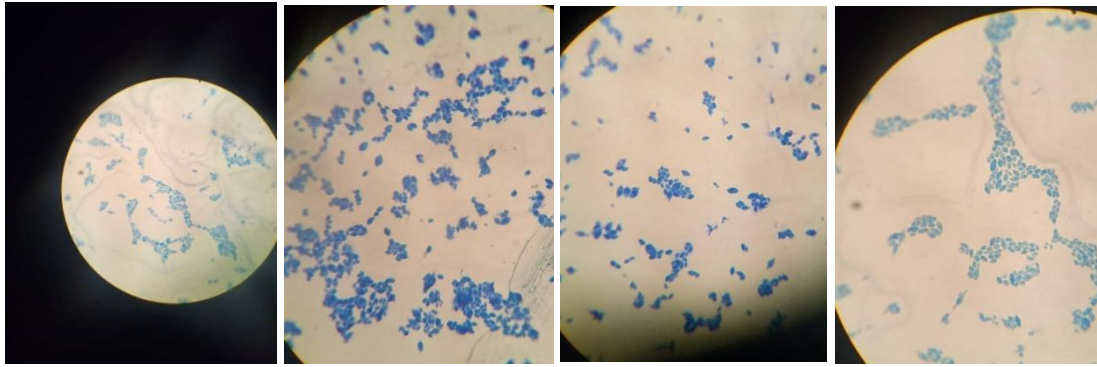


Figure 23 : Observation microscopique de certains isolats de levures isolés.

I.1.3. Résultat de teste catalase :

Les bulles d'oxygène se forment rapidement le teste est positif et cela indique la présence de l'enzyme catalase.

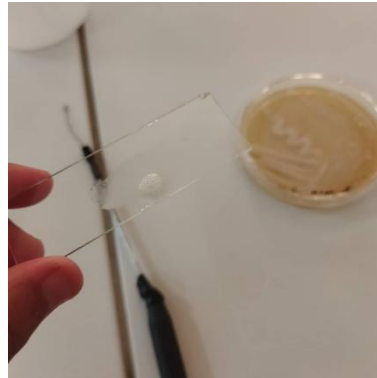


Figure 24 : le résultat du teste catalase

I.1.4. Résultat de la cinétique d'une croissance :

Le suivi de la croissance se fait en observant la vitesse s'explique de la façon suivante :

$$\text{➤ } U(x) = dx / X. dt = X' / X$$

Cette Vitesse peut se calculer à chaque instant, en fonction de ses variations son discontinue différentes phases de croissance.

Tableau 8 :répresentation de la cinétique d'une croissance

Jours	1 ^{er} Jour					2 ^{eme} Jour			
Temps (h)	0	2h	4h	6h	8h	2h	4h	6h	8h
T lu à 600 (mm)	0.320	0.335	0.345	0.370	0.445	0.345	0.350	0.360	0.500
Ln T	-1.13	-1.09	-1.06	-0.1	-0.8	-1.06	-1.05	-1.02	-0.7

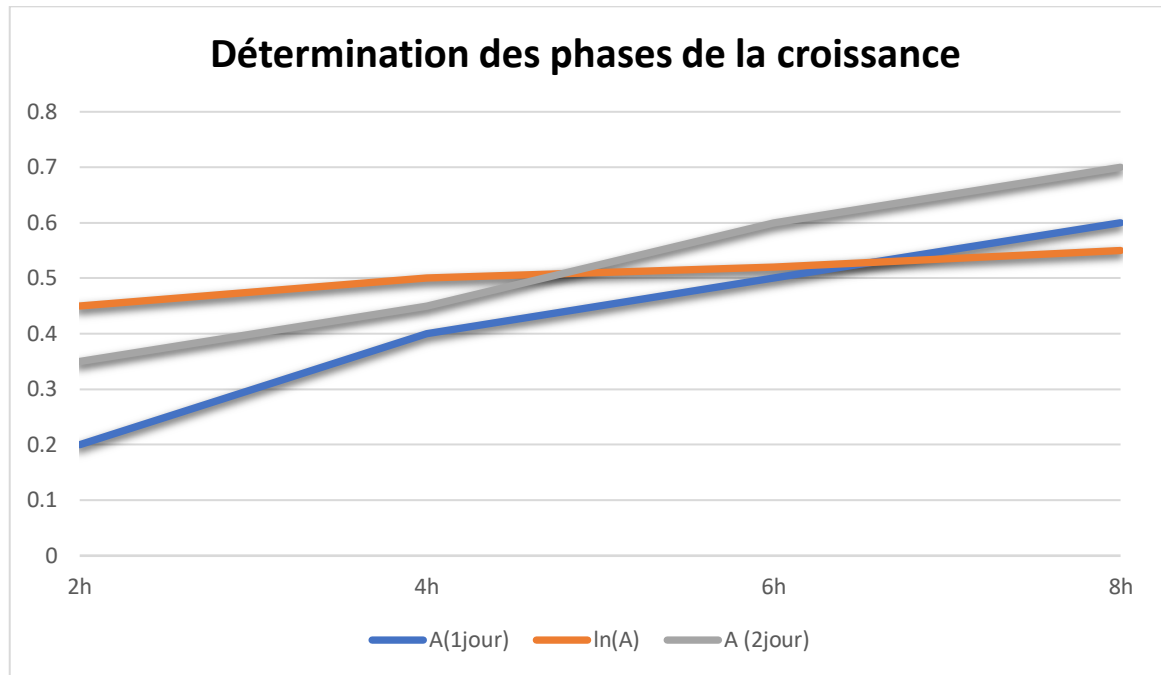


Figure 25 : Détermination des phases de la croissance : courbe $\ln(T60) = f(t)$

- Pour déterminer les phases, il faut tracer les tangentes à la courbe $\ln(t) = f(t)$
- Sur la dure buvée de l'expérience on observe les trois phases :

➤ **Phases de croissance :**

1. **Phase de latence** : Aucune croissance significative n'a été observée, indiquant l'adaptation des cellules au milieu.
2. **Phase exponentielle** : La densité optique (OD600) a augmenté rapidement, démontrant une activité métabolique optimale.
3. **Phase stationnaire** : La croissance a stagné en raison de l'épuisement des substrats (glucose).

I.1.5. Identification Biotechnologique des souches de S.C

I.1.5.1. Résultats du dosage de CO_2 et d'éthanol chez les souches de S.C

La fermentation est un processus métabolique convertissant généralement des glucides en gaz et en alcools pour extraire une partie de l'énergie chimique tout en ré oxydant les coenzymes réduites par ces réactions (Divol,

2004). La fermentation alcoolique est réalisée notamment par les levures et convertit des glucides tels que le glucose, le fructose et saccharose, diholoside formé des deux précédents en éthanol ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) et dioxyde de carbone CO_2 avec production d'une faible quantité d'énergie métabolique sous forme d'ATP (Timson, 2007). Le métabolisme énergétique de *Saccharomyces cerevisiae* peut être de type respiration aérobie (chaînes respiratoires mitochondriales) ou fermentatif (fermentation alcoolique). En présence de fortes concentrations en sucres comme le glucose, le fructose ou le saccharose (par exemple supérieures à 1.5 à 2.5 g/L), en condition aérées, *Sc* adopte un métabolisme énergétique essentiellement fermentatif (à 80%) et très peu de glucose est respiré (Sonderegger et Sauer, 2003).

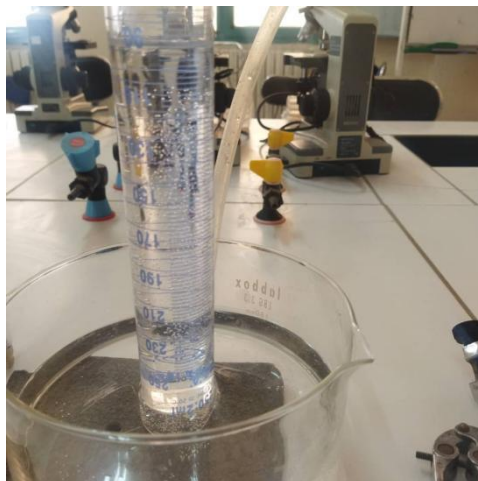
Afin de caractériser les souches de *Saccharomyces cerevisiae* à l'échelle biotechnologique, un test de fermentation alcoolique est réalisé pour mesurer la capacité de ces souches à produire le dioxyde de carbone CO_2 et de l'éthanol.

Tableau 9 : Quantités de CO_2 et d'éthanol résultant de la fermentation alcoolique

Souches	Quantités de CO_2	Quantités de l'éthanol
Souche	$7,95.10^4 \pm 3,42.10^{-5}$	$33,39 \pm 14.34$

D'après les résultats du tableau on remarque que les souches produisent des quantités importantes et non négligeables de CO_2 et d'éthanol lors de la fermentation. La plus grande quantité de CO_2 est estimée chez la souche.

- **Quantité de CO_2 générée :** Pendant la phase exponentielle, la production de CO_2 a atteint un pic, correspondant à une activité fermentaire maximale.
- **Relation avec l'activité fermentaire :** La production de CO_2 a diminué progressivement après l'épuisement du glucose, indiquant un passage de la fermentation alcoolique à un métabolisme mixte ou oxydatif.



I.1.6. Interprétation de résultats test du Fehling :

Le **test de Fehling** est une méthode classique pour détecter la présence de sucres réducteurs, comme le glucose, dans une solution. Dans le cadre d'une étude sur ***Saccharomyces cerevisiae***, ce test est utilisé pour évaluer l'utilisation des sucres pendant la fermentation et leur conversion en produits métaboliques.



- Arrêt la réaction :
- Refroidir rapidement les tube à l'eau froide après incubation pour stopper la réaction :

I.1.6.1. Mesure de l'absorbance :

- Mesure l'absorbance des échantillons à 600nm à l'aide de spectrophotomètre pour éviter que AB dépasse les limites de l'appareil :

Tableau 10 : représentation de l'impact de la concentration sur l'absorbance

$$A = 1.58 \quad \text{-----} \quad B = 0.138$$

Concentration	L'absorbance
0.1	3.365
0.2	3.18
0.3	1.64
0.4	0.154

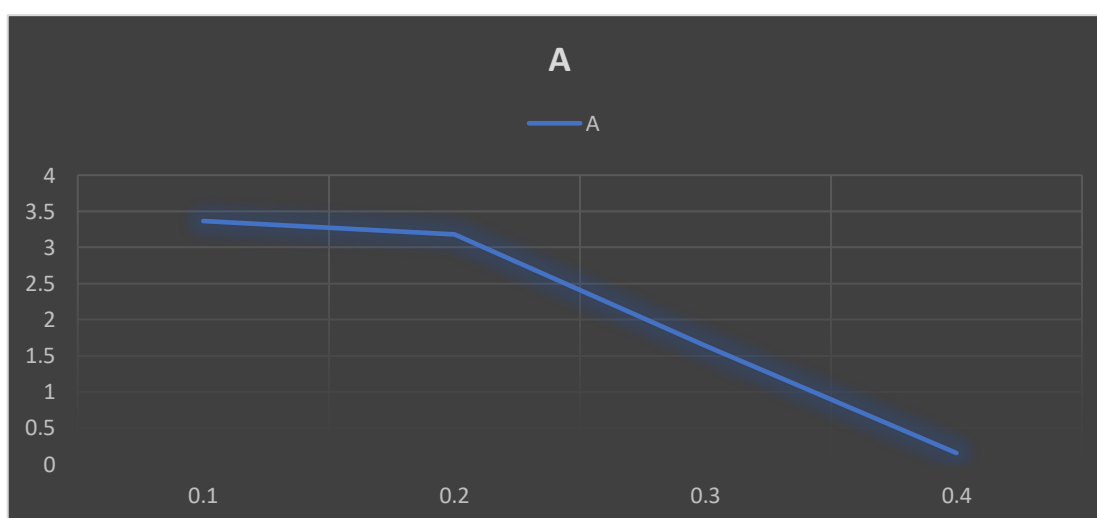


Figure 26 : représentation l'impact de la concentration sur l'absorbance

I.1.7. Résultat de centrifugation

➤ Séparation des phases :

- Après centrifugation, deux couches distinctes se forment :
- ***Pellet (culot)*** : Il se compose des cellules de levure, qui se sont accumulées au fond du tube.
- ***Supernatant (surnageant)*** : C'est le liquide clair qui reste au-dessus, constitué du milieu de culture et des résidus solubles.

➤ Récupération du culot de levure* :

- Le supernatant peut être délicatement aspiré à l'aide d'une pipette sans perturber le pellet. Les cellules de levure peuvent ensuite être lavées avec un tampon ou un milieu frais pour éliminer toute trace du milieu de culture.



I.1.8. Résultat de séchage

➤ Teneur en humidité finale

- La teneur en humidité a été réduite de **75 % (initial)** à **8 % (final)**, ce qui est conforme aux standards pour la conservation des levures actives sèches.
- À ces températures, l'évaporation de l'eau s'est faite lentement, limitant le stress thermique des cellules.

➤ 2. Viabilité cellulaire

- Une viabilité de **90-95 %** a été maintenue après séchage, ce qui indique que cette plage de température est adaptée à la préservation des cellules vivantes.
- La faible intensité thermique a minimisé les dommages aux membranes cellulaires et aux enzymes intracellulaires.

➤ 3. Activité fermentaire

- Les tests de fermentation ont montré une **activité enzymatique conservée à 90 %** par rapport à une levure fraîche.

- Une réhydratation des levures a permis de retrouver des capacités fermentaires comparables aux échantillons non séchés (excellentes performances pour la panification et la fermentation alcoolique).

➤ **5. Apparence et propriétés physiques**

- Les cellules séchées ont conservé une morphologie intacte, observée au microscope optique.
- Les granules obtenus sont homogènes, facilitant leur manipulation pour des applications industrielles.



1.2. Discussion générale :

D'une manière générale, en microbiologie des levures, l'étude se fait sur des cellules vivantes et permet de visualiser la morphologie cellulaire des souches. L'observation microscopique fait apparaître des cellules de formes ovoïdes, cylindriques et sphériques. Les levures possèdent différents types de bourgeonnements (monopolaire, bipolaire et multipolaire). La formation de ces derniers est influencée par plusieurs facteurs, parmi lesquels l'hétérothalisme c'est-à-dire pour que la sporulation puisse avoir lieu, les types sexuels doivent être compatibles. La composition du milieu est aussi un facteur important avec notamment, la présence d'une source de carbone fermentescible, d'une teneur en azote limitante et une bonne aération, nécessaires pour la sporulation (Bourgeois et al., 1998).

Par rapport aux résultats obtenus et en référence aux nombreuses études, il s'avère que la morphologie des micro-organismes est sujette à des variations

prononcées en fonction de l'espèce, ses particularités et ses conditions de culture.

La centrifugation a prouvé son efficacité pour récupérer les cellules, mais elle peut induire des stress mécaniques à des forces élevées. Les résultats montrent qu'un compromis doit être trouvé entre la vitesse de centrifugation et la viabilité cellulaire. Des ajustements, comme l'utilisation d'un gradient de densité, pourraient réduire les dommages mécaniques tout en maintenant une récupération élevée.

Les phases de croissance observées confirment un comportement typique de *Saccharomyces cerevisiae* dans un milieu riche en glucose. La phase exponentielle rapide et la productivité élevée en biomasse démontrent l'efficacité de cette souche pour des applications industrielles. Cependant, la transition vers la phase stationnaire met en évidence la nécessité de contrôler les paramètres du milieu (apport en nutriments ou aération) pour prolonger la croissance exponentielle dans certains contextes.

La production de CO₂ est un indicateur clé de l'activité fermentaire. Le pic observé pendant la phase exponentielle est corrélé à une consommation rapide du glucose et à la production d'éthanol. La diminution progressive de CO₂ après l'épuisement du substrat reflète un passage à un métabolisme de survie, caractérisé par une baisse de l'activité fermentaire.

- **Récupération des cellules (centrifugation) :** Indispensable pour la récolte efficace de la biomasse dans les industries agroalimentaires et biotechnologiques.
- **Cinétique de croissance :** Les données sur le taux de croissance et la productivité en biomasse sont essentielles pour optimiser la production industrielle (par exemple, dans la fabrication de levure de boulangerie ou de compléments alimentaires).
- **Production de CO₂ :** La mesure de la production de CO₂ peut servir d'outil de suivi en temps réel pour évaluer l'état physiologique des levures dans des processus fermentaires.

Pour améliorer les performances, des ajustements sont envisageables :

- Optimisation des vitesses de centrifugation ou exploration d'autres techniques de séparation (filtration tangentielle).
- Amélioration de la cinétique de croissance par l'ajout progressif de substrats ou l'enrichissement en oxygène.
- Contrôle du pH et des conditions de fermentation pour maximiser la production de biomasse et de métabolites secondaires.

Le **test de Fehling** est une méthode classique pour détecter la présence de sucres réducteurs, comme le glucose, dans une solution. Dans le cadre d'une étude sur **Saccharomyces cerevisiae**, ce test est utilisé pour évaluer l'utilisation des sucres pendant la fermentation et leur conversion en produits métaboliques.

1.Interprétation des résultats du test de Fehling

- Le changement de couleur et la formation d'un précipité rouge brique indiquent que les sucres réducteurs sont activement métabolisés par *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation.
- La disparition progressive des sucres réducteurs (confirmée par le test et par des mesures spectrophotométriques) reflète l'efficacité de la souche dans l'utilisation du glucose comme substrat principal pour produire de l'éthanol et du CO₂.

PARTIE VII CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

En conclusion, les levures jouent un rôle central dans de nombreux domaines grâce à leur diversité et leur adaptabilité écologique. Elles sont présentes dans des environnements naturels variés, notamment dans les vignobles où elles interviennent dans les processus de fermentation. Bien que la microflore des raisins soit dominée par des levures oxydatives et des moisissures, certaines espèces fermentaires, comme *Saccharomyces cerevisiae*, ont une importance particulière en raison de leur capacité à transformer les sucres en alcool. Ces levures fermentaires sont non seulement essentielles à la production de boissons alcoolisées, mais également à la production industrielle d'éthanol, un biocarburant de plus en plus valorisé.

Saccharomyces cerevisiae, en particulier, est devenue un organisme modèle pour la recherche, avec des utilisations allant de la production des levures à des applications en dépollution et en agroalimentaire. Grâce à une maîtrise accrue des processus de fermentation et à l'amélioration continue des systèmes de production, les levures représentent un enjeu important pour des avancées futures dans les biotechnologies industrielles et environnementales.

Pour enrichir cette conclusion, il est pertinent de souligner que l'étude des levures offre également des perspectives dans le domaine de la recherche fondamentale. Les propriétés uniques de certaines espèces, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, permettent de mieux comprendre les mécanismes génétiques et biochimiques universels, contribuant ainsi aux avancées en biologie cellulaire et en génétique. Par ailleurs, la capacité des levures à s'adapter à des environnements divers ouvre des possibilités d'innovation pour le développement de nouveaux procédés de fermentation et de bioconversion.

De plus, les levures pourraient jouer un rôle dans la transition écologique en tant qu'alternatives naturelles aux procédés chimiques pour la production de biocarburants et de produits biosourcés. Les recherches actuelles s'orientent vers la sélection et l'ingénierie de souches de levures capables de

dégrader des sources de carbone non traditionnelles, comme les déchets lignocellulosiques, pour produire de l'éthanol de manière plus durable. Ainsi, au-delà de leurs applications industrielles actuelles, les levures continuent de démontrer leur potentiel pour des innovations qui répondent aux enjeux environnementaux et énergétiques de demain.

PARTIE VIII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 24(6), 559-570.

Mermelstein, N. H. (2018). Combating antibiotic resistance. *Food Technology*, 72(3), 62-68.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology E-Book*. Elsevier Health Sciences.

OMS, (2020). *Résistance aux antimicrobiens*. Organisation mondiale de la santé. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.

Karam. Z. (1998). Bactéries lactiques isolées de lait de *Camelus dromedarius*: Etude microbiologique et biochimique, caractéristiques technologique, élaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages. Université d'Oran: Thèse doctorat d'état. <https://theses.univ-oran1.dz/document/TH5086.pdf>.
