



République Algérienne Démocratique et Populaire



Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES ALIMENTAIRES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

YAHLA Mohamed Ihab et Khalifa ALI

Pour l'obtention du diplôme de Master

Thème

Production de la Levure Boulangère

Soutenu le 30/06/2024 Devant le Jury

Présidente	Dr DERAMCHIA Nawel	MCA	Univ-Mosta
Encadrante	Dr YAHLA Imène	MCA	Univ-Mosta
Co-encadrant	Dr BENAMEUR Qada	MCA	Univ-Mosta
Examinatrice	Dr AIT CHABANE Ouiza	MCA	Univ-Mosta
Représentant de l'incubateur	Dr BENABDELMOUMENE Djilali	MCA	Univ-Mosta
Partenaire socio-économique	Dr Boutaiba Benklaouz Mekki	Dr	Mosta

Année universitaire 2023-2024

Remerciements

*Tout d'abord, nous tenons à remercier **DIEU** le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier tout d'abord notre chère encadrante **Dr. YAHLA Imène**, maitre de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour ses enseignements qui nous ont éclairés, pour ses encouragements et ses précieux conseils, pour l'orientation, la confiance, la gentillesse, sa compréhension et son aide sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous remercions davantage notre co-encadrant **Dr Benameur Qada**, Maitre de conférences A à l'université de Mostaganem, d'avoir participé à la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements également aux **Dr. DERAMCHIA Nawel**, **Dr AIT CHABANE Ouiza**, Maitres de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, et au **Dr. BENABDELMOUMENE Djilali**, Maitre de conférences A à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et membre de l'incubateur de l'université, qui nous ont fait l'honneur de faire partie du jury pour évaluer ce modeste travail.*

*Nous remercions également le **Dr Boutaiba Benklaouz Mekki** d'avoir accepté de faire partie du jury comme partenaire socio-économique*

*Nous adressons nos vifs remerciements à Mr **Benbouziane Djilali**, technicien du laboratoire pédagogique de microbiologie et à la technicienne du laboratoire des Microorganismes Bénéfique, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, **Mme Hamed Djahira***

*Nos vifs remerciements s'adressent au **Dr Benbouziane Bouasria** également.*

Enfin nous remercions tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

C'est avec immense fierté et respect que je dédie ce modeste travail :

A ceux qui donnent un sens à mon existence, à la lumière de mes yeux en témoignage de votre affection et de votre amour, pour votre patience et votre soutien pendant tous les moments que j'ai traversé,

*A ma très chère **mère** et Mon très cher **père**.*

J'espère Que dieu vous protège et vous garde.

A mes grands-parents

A ma très chère sœur Imène et sa petite famille

A ma très chère sœur Ines

A mon très cher frère Ilyes et sa petite famille

A mes nièces Aline et RYM Farah

A mon cher binôme Ali

A tous mes amis

Mohamed Ihab

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail présent entre vos mains, et qui est le fruit de plusieurs années d'effort et de travail continu :

A mon père « **Khalifa Sid Ahmed** » et frère « **Khalifa Abdelaziz** » et ma chère grand-mère « **Moujahida Khalifa Rabiha** » disparus trop tôt. J'espère que, du monde qui est le votre maintenant, ils apprécient cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils et frère qui a toujours prié pour le salut de votre âmes. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

A ma **chère mère** qui m'ont soutenue et encouragée le long de mes études, avec leurs moyens matériels et morales, ainsi que leurs prières, de ma première année de l'enseignement primaire jusqu'à la rédaction de ces mots.

A mes chères sœurs et frères « *Amine ; Zizou ; Djahida et sa petite famille ; Meriem* »

A mon binôme « *Ihab* »

A ma promo et mes amies

Aux deux familles de Khalifa ET Sebti.

A tous ce qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Khalifa Ali

Résumé

La production de levure boulangère, principalement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, est essentielle dans l'industrie alimentaire, notamment pour la fabrication du pain. Ce mémoire vise à produire la levure boulangère en optimisant les conditions de fermentation afin d'améliorer la production de biomasse. Nous nous concentrons sur l'impact des paramètres de culture, en particulier le pH et la densité optique (DO), sur la croissance et la productivité de la levure. Après l'isolement de la souche à partir des grappes du raisin et son identification, la fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* a été lancée dans la mélasse. Le suivi de la fermentation a été assuré pendant une période de 72 heures avec des mesures régulières de pH et de DO toutes les 12 heures. Les résultats obtenus montrent une diminution progressive du pH, ajustée à 5 après 48 heures, et une augmentation continue de la DO, indiquant une croissance cellulaire accrue. L'ajustement du pH s'est révélé crucial pour maintenir un environnement optimal pour la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Les observations démontrent que le contrôle rigoureux du pH et le suivi de la DO permettent de maximiser la production de biomasse de levure. Cette étude offre des insights précieux pour l'industrie de la levure boulangère, proposant des stratégies pour améliorer l'efficacité et la durabilité des procédés de production.

Mots clés : levure boulangère- *Saccharomyces cerevisiae*- fermentation- Biomasse.

Abstract

The production of baker's yeast, primarily of the species *Saccharomyces cerevisiae*, is essential in the food industry, particularly for bread making. This thesis aims to produce baker's yeast by optimizing fermentation conditions to improve biomass production. We focus on the impact of culture parameters, particularly pH and optical density (OD), on yeast growth and productivity. After isolating the strain from grape clusters and identifying it, the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* was initiated in molasses. Fermentation was monitored over a 72-hour period with regular measurements of pH and OD every 12 hours. The obtained results show a progressive decrease in pH, adjusted to 5 after 48 hours, and a continuous increase in OD, indicating increased cell growth. pH adjustment proved crucial for maintaining an optimal environment for the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Observations demonstrate that rigorous control of pH and monitoring of OD maximize yeast biomass production. This study provides valuable insights for the baker's yeast industry, proposing strategies to improve the efficiency and sustainability of production processes.

Keywords: baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, biomass.

المخلص

إنتاج خميرة الخبز، وخصوصاً نوع الساكارومييس سيرفيسيا، يعد أساسياً في صناعة الأغذية، خاصة في صناعة الخبز. تهدف هذه الدراسة إلى إنتاج خميرة الخبز من خلال تحسين ظروف التخمير لزيادة إنتاج (DO) والكثافة الضوئية (pH) الكتلة الحيوية. نركز على تأثير معايير الاستزراع، خاصة درجة الحموضة على نمو وإنتاجية الخميرة. بعد عزل السلالة من عنقيد العنب وتحديد هويتها، تم بدء تخمير الساكارومييس كل DO و pH سيرفيسيا في المولاس. تم مراقبة عملية التخمير على مدى 72 ساعة مع قياسات منتظمة لـ حيث تم تعديله إلى 5 بعد 48 ساعة، وزيادة مستمرة pH 12 ساعة. أظهرت النتائج انخفاضاً تدريجياً في كان حاسماً للحفاظ على بيئة مثالية لنمو pH مما يشير إلى زيادة في النمو الخلوي. تبين أن تعديل DO في يساعدان في تحقيق DO ومتابعة pH الساكارومييس سيرفيسيا. أظهرت الملاحظات أن التحكم الدقيق في أقصى إنتاج للكتلة الحيوية للخميرة. تقدم هذه الدراسة رؤى قيمة لصناعة خميرة الخبز، مقترحة استراتيجيات لتحسين كفاءة واستدامة عمليات الإنتاج.

.الكلمات المفتاحية: خميرة الخبز - الساكارومييس سيرفيسيا- التخمير - الكتلة الحيوية

Listes des tableaux

Tableau N°01 : Classification des levures P07

Tableau N°02 : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures P09

Tableau N°03 : Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae* P12

Tableau N°04: Les principales applications de *S. cerevisiae* P14

Tableau N°05 : Ensemble des caractères macroscopiques P22

Tableau N°06 : Caractéristique macroscopique de la levure isolées P26

Listes des Figures

Figure N°01 : Structure d'une cellule levurienne.	P04
Figure N°02 : Reproduction asexuée par bourgeonnement .	P05
Figure N°03 : Cycle de reproduction asexuée et sexuée d'une levure à ascospore .	P06
Figure N°04 : Micrographie de <i>S. cerevisiae</i> .	P12
Figure N°05 : Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i> .	P13
Figure N°06 : Vignobles de la plaine de Sidi Lakhdar (Wilaya deMostaganem).	P18
Figure N°07 : La photo de cépage étudié (Cinsault).	P19
FigureN°08 : Dénombrement de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur le milieu YPD à 37°C.	P25
FiguresN°09 : Résultats des tests catalase, coloration de Gram et aspects microscopiques de nos levures.	P25
FigureN°10 : Observation microscopique de la levure après coloration de Gram.	P26
Figure N°11 : Évolution du pH en fonction du temps.	P27
Figure N°12 : Évolution de la densité optique au cours de la fermentation.	P28

Table des Matières

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	P01
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Les levures	P03
I.1. Historique	P03
I.2. Caractéristiques microbiologiques des levures	P03
I.2.1. Définition	P03
I.2.2. Morphologie et Structure	P03
I.2.3. Habitats	P04
I.2.4. Reproduction des levures	P05
A. Reproduction asexuée ou végétative	P05
B. Reproduction sexuée.	P05
I.2.5. Classification	P06
I.3. Physiologie et Croissance des levures	P08
I.3.1. Besoins nutritifs	P08
Sources de carbone	P08
Sources d'azote	P08
Oligoéléments et facteurs de croissance	P09
I.3.2. Les conditions physicochimiques de croissance	P09
La température	P09
Le pH	P10
La pression osmotique et l'activité d'eau	P10
L'oxygène	P10
I.3.3. Le métabolisme	P10
Métabolisme oxydatif	P10
Métabolisme fermentaire	P11
I.4. Les levures en biotechnologie	P11

I.5. Données sur Saccharomyces cerevisiae	P11
I.5.1. Définition	P11
I.5.2. Classification	P12
I.5.3. Morphologie	P12
I.5.4. Reproduction	P13
I.6. Conditions de culture de la levure S.cerevisiae	P13
I.6.1. Exigences culturelles	P13
I.6.1.1. Le pH	P13
I.6.1.2. La température	P13
I.6.1.3. La pression osmotique	P13
I.7. Besoins nutritionnels	P14
L'eau	P14
Le carbone	P14
L'azote	P14
I.8. Principales applications de S.cerevisiae	P14
I.9. Raisin et Vignoble	P15
I.9.1. Histoire	P15
I.9.2. Définition	P15
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	
II.1. Objectif	P17
II.2. Matériels utilisés	P17
II.2.1. Appareillage	P17
II.2.2. Réactifs et Milieux de Cultures	P17
II.2.3. Verrerie et petit matériel	P17
II.3. Présentation des régions de la récolte de raisin	P18
II.3.1. La région Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem)	P18
Géographie et Climat	P18
II.4. Sources de prélèvement des levures	P19
Cépage Cinsault (la région Sidi Lakhder de la wilaya de Mostaganem)	P19
II.5. Isolement, purification et conservation des isolats	P19
II.5.1. Techniques de prélèvement des grappes de raisin	P20
II.5.2. Préparation des extraits de raisin	P21
II.5.3. Isolement des levures	P21
Technique	P21

II.5.4. Purification des levures	P21
II.5.5. Conservation des levures	P22
II.6. Études des caractéristiques culturelles	P22
II.6.1. Observation macroscopique	P22
II.6.2. Observation microscopique	P22
1. Observation microscopique sans coloration	P22
2. Observation microscopique après coloration par le bleu de méthylène	P22
3. Méthode de la coloration avec le bleu de méthylène	P22
II.7. Caractérisation moléculaire des isolats de levures	P22
II.8. Production de la levure boulangère	P23
II.8.1. Préparation du Milieu de Culture	P23
Préparation de la Mélasse	P23
II.8.2. Stérilisation	P23
II.8.3. Inoculation de la Souche	P23
• Préparation de l'Inoculum	P23
• Inoculation	P24
II.8.4. Fermentation	P24
• Conditions de Fermentation	P24
II.8.5. Suivi de la Fermentation	P24
II.8.6. Observation Microscopique	P24
II.9. Fin de la Fermentation	P24
III.9.1. Récupération des Cellules	P24
II.9.2. Conservation des Cellules	P24
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1. Isolement et purification de la levure	P25
III. 2 Observation Microscopique et macroscopique	P25
Identification microbiologique	P26
III.4. Caractérisation moléculaire	P26
III. 5. Évolution de la fermentation	P27
III.5.1. Évolution du pH au cours de la fermentation	
III.5.2. Évolution de la densité optique (DO) au cours de la fermentation	P27
III.6. Discussion	P28
Conclusion	P30

Table des Matières

Références bibliographiques

Annexe

Liste des Abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
 - CO₂ : Dioxyde de carbone
 - COA : Coenzyme A
 - DO : Densité optique
 - H₂O : Oxyde de dihydrogène
 - H₃O : Ion hydronium
 - HCl : Acide chlorhydrique
 - KH₂PO₄ : Phosphate de monopotassium ou dihydrogénophosphate de potassium
 - Mg : Magnésium
 - Nm : Nanomètre
 - NaOH : Hydroxyde de sodium
 - OH : Hydroxyle
 - P/V : Poids pour volume
 - PCR : Polymerase Chain Reaction
 - Rpm : Rupture prématurée des membranes
 - S : Saccharomyces
 - SO₄ : Sulfate
 - YPG : Yeast Peptone Dextrose
 - µm : Micromètre
-

Introduction

INTRODUCTION

L'importance économique et industrielle de la levure boulangère, principalement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, ne peut être sous-estimée. Utilisée depuis des millénaires dans la fabrication de pain et de boissons alcoolisées, cette levure joue un rôle crucial dans les industries alimentaires et biotechnologiques modernes. Sa capacité à fermenter les sucres pour produire du dioxyde de carbone et de l'éthanol est au cœur des procédés de panification et de brassage (*Walker, 2011*).

La production de levure boulangère a évolué considérablement, passant des techniques artisanales à des méthodes industrielles sophistiquées. Aujourd'hui, la production à grande échelle de cette levure est réalisée dans des bioréacteurs où des conditions optimales de croissance sont maintenues pour maximiser la biomasse et la viabilité cellulaire. Un aspect crucial de ce processus est la gestion des paramètres de culture, tels que le pH et la densité optique (DO), qui influencent directement la santé et la productivité des cultures de levure (*Mayer et al., 2019*).

L'ajustement du pH pendant la fermentation est essentiel pour maintenir un environnement favorable à la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*. Le pH influence non seulement la vitesse de croissance des levures mais aussi la production de métabolites secondaires, comme l'éthanol. Des études ont montré que des conditions de pH suboptimales peuvent conduire à une production accrue de sous-produits indésirables et à une diminution de la viabilité cellulaire (*Narendranath & Power, 2005*).

La densité optique (DO) à 600 nm est couramment utilisée comme mesure indirecte de la concentration en cellules de levure. Cette méthode permet de suivre la croissance des cultures en temps réel et d'ajuster les conditions de culture en conséquence. Une augmentation de la DO indique une prolifération cellulaire, tandis qu'une diminution peut signaler un stress ou une mortalité cellulaire (*Madigan et al., 2017*).

Cette étude vise à isoler et identifier les souches indigènes de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de raisins en fermentation de cépages algériens, en utilisant des techniques microscopiques et moléculaires, et à caractériser ces souches pour des applications biotechnologiques.

En outre, le but de cette startup est de produire la levure boulangère et d'examiner les méthodes de suivi de la fermentation, en mettant l'accent sur le contrôle du pH et de la DO. Ce travail se propose d'optimiser les conditions de fermentation pour améliorer la production de biomasse de levure tout en minimisant la formation de sous-produits indésirables. En particulier, nous nous concentrerons sur les ajustements du pH après 48 heures de fermentation et leur impact sur la croissance cellulaire et la productivité globale du processus.

Dans cette étude, nous utiliserons des données expérimentales pour analyser les tendances de croissance des levures en fonction du pH et de la DO, et discuterons des implications de ces paramètres sur l'efficacité de la production industrielle de levure boulangère. Les résultats de cette recherche contribueront à améliorer les pratiques de fermentation, avec des bénéfices potentiels pour les industries de la boulangerie et de la biotechnologie.

Étude
Bibliographique

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les levures

I.1. Historique

Les levures sont les premiers micro-organismes utilisés par l'homme depuis des millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation (*Leveau et Bouix, 1991 ; Pol, 1996*). Elles sont également les premiers microorganismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek, en 1680, qui les a dessinées. Ce n'est qu'avec les travaux de Pasteur (1822-1895) que le rôle des levures dans la fermentation alcoolique a été mis en évidence. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie avec notamment les travaux de Büchner. A l'heure actuelle, les levures constituent un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de microorganisme et d'eucaryote (*Pol, 1996*).

I.2. Caractéristiques microbiologiques des levures

I.2.1. Définition

Le mot levure, selon Phaff et al., (1968), provient du mot latin « levare » qui se traduit par lever. Ce mot a été appliqué aux levures en raison de l'aptitude de ces microorganismes à produire du CO₂ pendant la fermentation et à lever la surface mousseuse d'un milieu liquide de fermentation (*Oteng-Gyang, 1984*).

Les levures sont des eucaryotes microscopiques hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons à caractère unicellulaire et sans vrai mycélium (au moins dans la plus grande partie de leur cycle biologique) (*Guiraud, 1998*).

I.2.2. Morphologie et Structure

Comme la levure est un organisme eucaryote unicellulaire, elle est constituée par une cellule qui présente une structure plus complexe que celle de la bactérie (procaryote) notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de Golgi et de plus d'un chromosome (*Saccharomyces cerevisiae* a 16 chromosomes) (*Labrecque, 2003*).

La cellule de levure est généralement ovoïde ou sphérique, mais chez certaines espèces elle a d'autres formes spécifiques : triangulaire, ogivale, en forme de citron ou même en forme de bouteille. La taille de la cellule de levure varie de quelques microns jusqu' à 25 à 30 microns. Selon les espèces, les cellules peuvent être isolées ou peuvent former des associations cellulaires ou se présenter sous forme filamenteuse à un certain stade de leur vie (*Bouix et Leveau, 1991*).

La cellule de levure comporte :

- Une membrane cytoplasmique, protégée par la paroi cellulaire, assure les échanges avec l'extérieur.
- Une paroi rigide, de 15 à 230 nm d'épaisseur, caractérisée par la présence de polysaccharides (surtout mannane et glucane, la chitine) des protéines dont certaines sont des enzymes (invertase).
- Un cytoplasme, une sorte de gelée, constitue le substrat même de la vie de la cellule.
- Un noyau, qui contient les chromosomes (éléments qui portent les caractéristiques génétiques), règle la transmission des caractères héréditaires et l'essentiel des réactions qui se produisent à l'intérieur de la cellule.
- Des vacuoles qui emmagasinent les substances de réserve diverses.
- Des mitochondries qui, en présence d'oxygène, sont les véritables centrales énergétiques de la cellule. Leur rôle est d'utiliser les sucres mis à la disposition de la levure pour produire de l'énergie et permettre ainsi à la cellule d'assurer sa croissance.
- Des ribosomes qui sont de petites structures (ou organites) présentes dans le cytoplasme des cellules. Ce sont eux qui assemblent les acides aminés pour former les protéines. Ils suivent pour cela le plan de montage contenu dans l'ADN (*Bourgeois et Larpent, 1996 ; Larpent, 1991*).

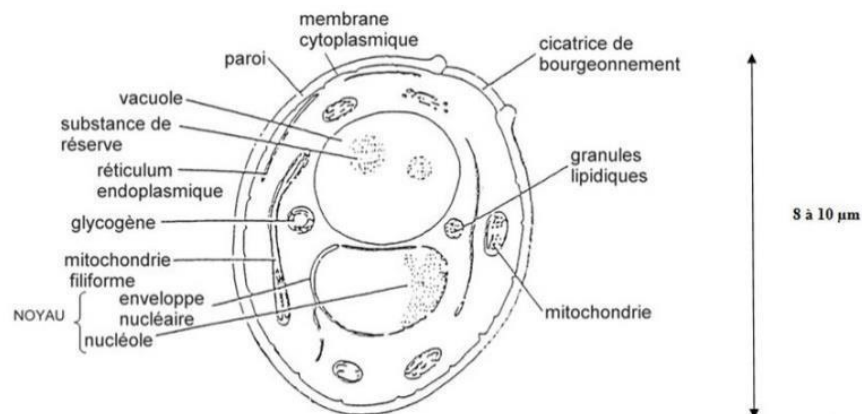


Figure N°01 : Structure d'une cellule levurienne (*Révy, 2005*)

I.2.3. Habitats

Les levures sont des espèces ubiquitaires donc elles sont largement distribuées dans la nature. Elles se rencontrent surtout chez les végétaux riches en sucres directement assimilables (*Leveau et Bouix, 1991*). En effet, les milieux fortement concentrés en sucres représentent un de leur environnements préférés, comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits

(les pommes, les raisins) (*Leclerc, 1975 ; Oteng-Gyang, 1984*). Des levures peuvent également vivre à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants et aussi dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (*Leveau et Bouix, 1993 ; Pol, 1996*).

Par ailleurs, le sol constitue un large réservoir assurant leur survie dans des conditions défavorables (*Leclerc, 1975*).

I.2.4. Reproduction des levures

Généralement, dans des conditions favorables à leur croissance, les levures se multiplient par reproduction asexuée (bourgeoisement ou scissiparité) mais dans des conditions défavorables, la reproduction est sexuée (*Bonaly, 1991*).

A. Reproduction asexuée ou végétative

Généralement les levures se multiplient par bourgeoisement. (*Larpent et Larpent- Gourgaud, 1997*). C'est le processus asexué au cours duquel la cellule mère émet une petite excroissance ou bourgeon qui augmente de taille et s'organise à l'aide d'une partie du matériel nucléaire et cytoplasmique de la cellule parentale (*Leclerc et al., 1983*). Cette multiplication se traduit, lors de la séparation des cellules, par la formation d'une cicatrice de bourgeoisement sur la cellule mère et d'une cicatrice de naissance sur le bourgeon (*Belin, 1972*). Dans le mode de multiplication par bourgeoisement, il ne se forme pas deux bourgeons sur le même site (sauf cas de bourgeoisement bipolaire) et le nombre de bourgeons par cellule se trouve donc limité (*Miller, 1983*).



Figure N°02 : Reproduction asexuée par bourgeoisement (*Leclerc et al., 1995*)

B. Reproduction sexuée

Les levures appartiennent aux eucaryotes et de ce fait, présentent les caractéristiques de la division méiotique: fusion de deux noyaux haploïdes, formation d'un noyau diploïde. La persistance de la membrane nucléaire pendant la division conduit à une structure en 4 lobes autour desquels se forme une paroi qui entraîne la rupture de la membrane nucléaire et l'individualisation des spores. La reproduction sexuée s'effectue par conjugaison de deux

cellules qui donnent naissance à un zygote. Les levures ascomycètes présentent des phénomènes de reproduction sexuée par formation d'un asque renfermant des ascospores issues de la méiose. (Bourgeois et Leveau, 1991). Après différenciation et méiose un asque à 4 ascospores haploïdes se forme (Oteng-Gyang, 1984).

Certaines levures sporogènes forment des spores sur n'importe quel milieu, en revanche, d'autres exigent des conditions de croissance ou de sporulation bien déterminées. En l'absence de ces conditions, une levure sporogène peut se multiplier indéfiniment par voie végétative (Bourgeois et Larpent, 1989). Un exemple de cycle de reproduction asexuée et sexuée d'une levure à ascospore, est donné par la figure N°03.

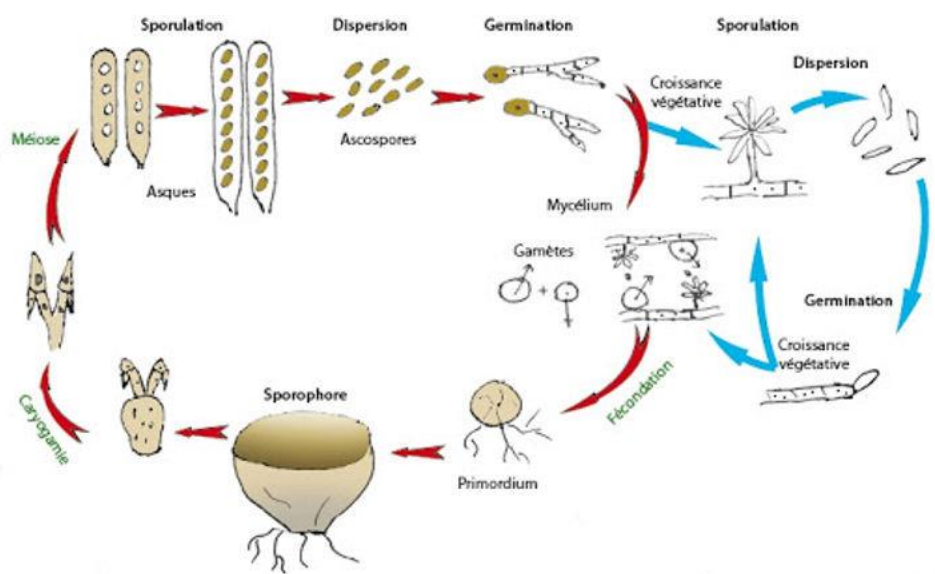


Figure N°03: Cycle de reproduction asexuée et sexuée d'une levure à ascospore (Larone, 2011)

I.2.5. Classification

Selon leur mode de reproduction, les levures se divisent en trois grandes classes (Kreger-Van, 1984 ; Lodder, 1971 ; Bouix et Leveau, 1991) :

- 1) Les ascomycètes : se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.
- 2) Les basidiomycètes : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- 3) Les deutéromycètes : regroupent l'ensemble des levures ne présentant pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

Tableau N°01 : Classification des levures (*Kreger-Van, 1984 ; Spencer et Spencer, 1993*)

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
1.Schizosaccharomycetoidea <i>Schizosaccharomyces</i> (4) *	Levures formant des téliospores	Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> (6)
2. Saccharomycetoidea <i>Ambrosiozyma</i> (4) <i>Arthroascus</i> (1) <i>Arxiozyma</i> (1) <i>Citeromyces</i> (1) <i>Clavispora</i> (1) <i>Cyniclomyces</i> (1) <i>Debaryomyces</i> (9) <i>Dekkera</i> (2) <i>Guilliermonedella</i> (1) <i>Hansenula</i> (30) <i>Issatchenkia</i> (4) <i>Kluyveromyces</i> (11) <i>Lodderromyces</i> (1) <i>Pachysolen</i> (1) <i>Pachytichospora</i> (1) <i>Pichia</i> (56) <i>Saccharomyces</i> (7) <i>Saccharomycopsis</i> (1) <i>Schwanniomyces</i> (1) <i>Sporopachydermia</i> (2) <i>Stephanoascus</i> (1) <i>Torulaspora</i> (3) <i>Wickerhamiella</i> (1) <i>Wingea</i> (1) <i>Yarrowia</i> (1) <i>Zygosaccharomyces</i> (8)	<i>Leucosporidium</i> (5) <i>Rhodosporidium</i> (8) <i>Sporidiobolus</i> (4) Filobasidiaceae <i>Chionosphaera</i> (1) <i>Filobasidiella</i> (1) <i>Filobasidium</i> (3) Sirobasidiaceae et Tremellaceae <i>Fibulobasidium</i> (1) <i>Sirobasidium</i> (1) <i>Holtermannia</i> (1) <i>Tremella</i> (9) Levures non classées <i>Sterigmatosporidium</i>	<i>Sporobolomyces</i> (7) Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> (1) <i>Brettanomyces</i> (9) <i>Candida</i> (196) <i>Cryptococcus</i> (19) <i>Eeniella</i> (1) <i>Fellomyces</i> <i>Kloeckera</i> (6) <i>Malassezia</i> (2) <i>Oosporidium</i> (1) <i>Phaffia</i> (1) <i>Rhodotorula</i> (10) <i>Schizoblastosporion</i> (1) <i>Sterigmatomyces</i> (6) <i>Sympodiomyces</i> (1) <i>Trichosporon</i> (15) <i>Trigonopsis</i> (1)
3.Lipomycetoideae		

<i>Lipomyces</i> (5) 4.Nadsonioideae <i>Hanseniaspora</i> (6) <i>Nadsonia</i> (3) <i>Saccharomycodes</i> (1) <i>Wickerhamia</i> (1) Spermophthoraceae <i>Coccidiascus</i> (1) <i>Metschnikowia</i> (6) <i>Nematospora</i> (1)		
--	--	--

I.3. Physiologie et Croissance des levures

I.3.1. Besoins nutritifs

Pour se maintenir, croître et se reproduire, la levure doit trouver dans son milieu de vie les éléments nutritifs et les conditions physico-chimiques favorables à sa croissance.

➤ **Sources de carbone**

Les sources carbonées sont d'une grande importance pour les champignons puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés. Les levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie.

(*Botton, 1991*). Les sources de carbone les plus efficaces sont des oses (glucose, fructose et mannose) qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées (*Pol, 1996*). D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles et sont capables d'oxyder des acides organiques et des alcools (éthanol, Glycérol) (*Oteng-Gyang, 1984*).

➤ **Sources d'azote**

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote pour la biosynthèse de leurs composés azotés (*Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Guiraud, 1998 ; Walker et al., 1997 ; Bouix et Leveau, 1999*) :

- sources organiques : les acides aminés, l'urée, la biotine et les bases puriques et pyrimidiques

- sources inorganiques : l'assimilation des ions ammoniums est largement répandue mais des espèces se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés comme source d'azote. Les levures ne peuvent pas fixer l'azote libre.

➤ **Oligoéléments et facteurs de croissance**

Les levures ont besoin d'éléments minéraux et de facteur(s) de croissance pour assurer leur développement. Il s'agit de substances nécessaires à de très faibles concentrations mais indispensables à leur vie (*Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992*).

L'importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures est donné comme suit.

Tableau N°02 : Importance de certains oligoéléments et vitamines pour la croissance des levures (*Walker, 2000 ; Lourens et Reid, 2002*).

Oligoéléments et facteurs de croissance	Rôle joué
Magnésium	- Stabilité et perméabilité des membranes. - Protection de la cellule contre les facteurs négatifs, tels que le choc thermique et la toxicité de l'éthanol.
Manganèse	- pour la synthèse de la thiamine et des protéines, ce qui contribue à l'augmentation de la biomasse.
Zinc	- Coenzymes pour certains enzymes. - Contribution à la synthèse de la riboflavine et certaines protéines.
Biotine	- Essentielle dans les réactions de carboxylation et de décarboxylation. - Production des alcools et des esters.
Thiamine	- Synthèse de l'isoleucine et de la valine.
Acide pantothénique	- Synthèse de l'Acétyl -COA. - Production des acides gras et des acides aminés.

I.3.2. Les conditions physicochimiques de croissance

Un certain nombre de facteurs physicochimiques du milieu influencent la croissance des levures. Les facteurs les plus importants sont :

➤ **La température**

La température optimale de développement des levures se situe généralement entre 25 °C et 30 °C, mais il existe des levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles.

D'une façon générale, les levures ne sont pas thermorésistantes. La destruction cellulaire commence dès 52 °C (contre 120 °C pour les bactéries thermophiles). Les levures sont aussi sensibles à la congélation et à la lyophilisation avec une grande variabilité selon les genres et les espèces, et selon la phase de croissance (les cellules en phase exponentielle résistent moins que les cellules en phase stationnaire) (*Oteng-Gyang, 1984 et Leveau et Bouix, 1993*).

➤ **Le pH**

Les enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H₃O⁺ et OH⁻. Les levures tolèrent donc des gammes de pH très larges, théoriquement de 2,4 à 8,6 (*Larpen et Larpen Gaurgaud, 1997*).

➤ **La pression osmotique et l'activité d'eau**

La plupart des souches ne peuvent se développer pour une activité de l'eau inférieure à 0,90 ; mais certaines tolèrent des pressions osmotiques plus élevées, correspondant à une activité de l'ordre de 0.60, en ralentissant leur métabolisme ; ces levures sont dites xérotolérantes (*Leveau et Bouix, 1979 ; Larpen et Larpen Gaurgaud, 1997*).

➤ **L'oxygène**

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène, il n'y a pas de levures anaérobies strictes. Ainsi, certaines levures sont aérobies strictes et d'autres sont aéro-anaérobies facultatives préférant, selon la quantité d'oxygène dans le milieu et des espèces, un métabolisme soit fermentaire, soit respiratoire (*Bouix et Leveau, 1991*).

I.3.3. 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 et l'entrée dans cette voie varie selon le glucide tandis que la destinée du pyruvate dépend à la fois du sucre utilisé et de l'espèce de levure considérée. En se référant au catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose, on peut distinguer deux types de métabolisme (*Botton et al., 1990*) :

- **Métabolisme oxydatif**

Les levures utilisant le glucose en présence d'oxygène, par conséquent, leur métabolisme est exclusivement respiratoire et le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs. Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux levures une importante multiplication. 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 (*Larpen, 1991*).

• **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 plus petites quantités. Ce métabolisme est moins énergétique que le métabolisme oxydatif (*Guiraud et Rosec, 2004*).

I.4. Les levures en biotechnologie

Par leur 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 d'enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases) (*Simon et Meunier, 1970*), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production de protéines (*Scriban, 1984 ; Leclerc et al., 1995*). Les biotechnologies et la recherche biomédicale exploitent aussi largement ces microorganismes, pour la production de molécules d'intérêt médical (ex : production de protéines hétérologues, comme le vaccin de l'hépatite B) (*Mercier, 1997 ; Blin, 2002*).

I.5. Données sur *Saccharomyces cerevisiae*

I.5.1. Définition

Saccharomyces cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie «sucre», myces « champignon », tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», 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 (*Larpen 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.5.2. Classification

La place de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la classification des êtres vivants est brièvement rappelée au tableau N°03.

Tableau N°03 : Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*Larpent,1992*).

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

I.5.3. 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 20µm de longueur ou plus (*Goffeau et al., 1996*).



Figure N°04 : Micrographie de *S. cerevisiae* (*Tortora et Anagnostakos, 1987*).

I.5.4. 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 N°05. 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*).

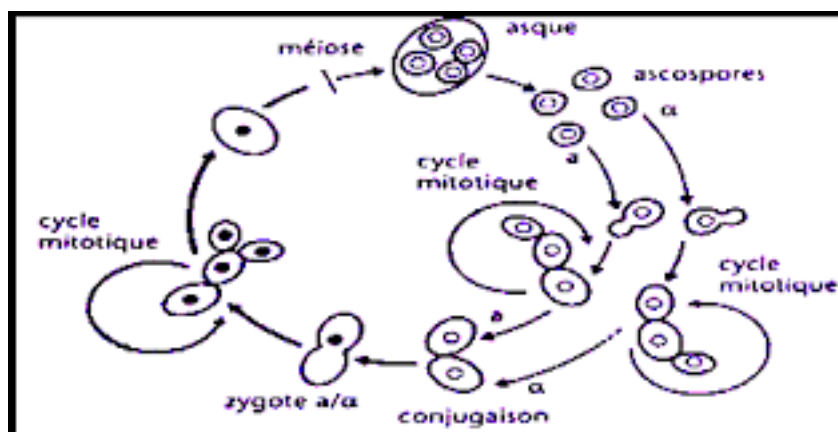


Figure N°05: Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae* (*Bourgeois et Larpent, 1996*).

I.6. 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.6.1. Exigences culturelles

I.6.1.1. 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*).

I.6.1.2. 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*).

I.6.1.3. 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.7. 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 ; acide nucléique et des vitamines (*Larpen, 1992*).

I.8. 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 N°04 : Les principales applications de *S. cerevisiae* (*Camonis, 1990*).

Produits de <i>S. cerevisiae</i>	Applications
Alcool et CO ₂	Fabrication du pain, du vin, de la bière
Ethanol	Solvant
Glycérol	Chimie des matières plastiques industrie pharmaceutique
Protéines alimentaires (à partir des mélasses et divers déchets alimentaires)	Alimentation de l'homme ou du bétail
Invertase	Confiserie

I.9. Raisin et Vignoble

I.9.1. Histoire

La vigne *Vit.* C'est l'une des plantes les plus diversifiées qui soient, et certainement qui a fait le plus rêver les hommes depuis l'Antiquité (*Bettane et al., 2010*). En provenance d'Asie Mineure, le raisin était présent à l'état naturel puis diffusé ensuite vers l'Ouest. Lorsque la récolte était amplement suffisante, le raisin était broyé en jus, puis réservé dans les jarres de terre, c'est alors que 4000 ans avant notre ère débuta la maîtrise du processus de vinification et de la viticulture. Dans l'Antiquité, les Grecs et les Romains, répandirent la culture de la vigne dans tout l'Empire. Et à partir de là, la culture de la vigne fut domestiquée et de très nombreuses variétés de raisins virent le jour uniquement pour la viticulture et peu à peu, l'homme a commencé à maîtriser la culture de la vigne (*Retoumard, 2005*).

L'Algérie est le plus vaste pays du Maghreb, en a partagé le sort des phéniciens à l'empire ottoman, en passant par les romains, la conquête arabe, les temps des barbaresques, l'occupation espagnole. La conquête française (1830) ne trouve que 2000 hectares de vignes ; ils deviendront 30.000 en 1870, 125.000 en 1888, pour atteindre le maximum de 407.000 hectares en 1951-1954 en produisant jusqu'à 19 millions d'hectolitres. Au moment de l'indépendance de l'Algérie, la vigne couvrait encore 350.000 hectares soit 10% des terres cultivées, avec une production variant de 14 à 18 millions d'hectolitres. Par le temps, la plus grande partie de ce vignoble a été arrachée, le vignoble « pied noir » en très bon état général s'est désagrégé par pertes de compétences et volontés politiques. Aujourd'hui, ce vignoble reste le plus important du Maghreb, soutenu par diverses tentatives, relance souvent freinées par les incertitudes politiques (*Blouin, 2007*).

I.9.2. Définition

La vigne est un arbrisseau rampant, de la famille botanique des vitacées essentiellement de l'espèce *Vitis* (*Hédalgo et al., 2005*). Schématiquement comme toutes les autres plantes comparables, un plant de vigne est formé d'une partie souterraine, les racines et radicelles, et d'une partie aérienne formant le tronc qui supporte les sarments, les rameaux, les fleurs devenant fruit-raisin (*Carbonneau et al., 2007*).

Le raisin est le fruit de la vigne du genre *Vitis vinifera*. C'est le deuxième fruit le plus cultivé au monde (classement de l'année 2000). C'est une baie charnue qui a plusieurs formes possibles

en fonction des variétés. Il est constitué d'un péricarpe et de graines appelées pépins qui sont au nombre maximum de 4 par baie pour la majorité. Il sert surtout à la fabrication du vin à partir de son jus fermenté, mais il se consomme également comme un fruit, soit frais, le raisin de table, soit sec, le raisin sec. On extrait aussi l'huile de pépins de raisin (Cadet, 2005).

Matériels
et
Méthodes

CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES

La première partie de ce travail qui consiste à l'isolement a été réalisé au laboratoire pédagogique de microbiologie N°2 au site de l'ITA tandis que la partie de la fermentation à été réalisée au laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé, site INES de l'université de Mostaganem.

II.1. Objectif

L'objectif de cette étude consiste à l'isolements de la souche *saccharomyces cerevisiae* et l'étude de quelques aptitudes technologiques et moléculaires pour la production de la levure boulangère.

II.2. Matériels utilisés

II.2.1. Appareillage

- ❖ Autoclave
- ❖ Étuve bactériologique
- ❖ Agitateur magnétique avec plaque chauffante
- ❖ Microscope optique
- ❖ Thermomètre
- ❖ Vortex
- ❖ Balance de précision
- ❖ Bain marie
- ❖ Bec bensen
- ❖ PH-mètre

II.2.2. Réactifs et Milieux de Cultures

- ❖ Éthanol 70%
- ❖ Milieu de culture pour levures (composé de mélasse et d'autres nutriments)
- ❖ Milieu de culture YPD (Yeast, Peptone, Dextrose) pour les levures
- ❖ Antibiotique Gentamicine 25mg.

II.2.3. Verrerie et petit matériel

- ❖ Pipettes
- ❖ Erlenmeyers de 500 ml et 1000 ml
- ❖ Pasteur, Ballons à fond rond
- ❖ Flacons en verre (de 250 ml),
- ❖ Tubes à essai, à visse en Verre,

- ❖ Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml ...),
- ❖ Boîtes de pétri en plastique,
- ❖ Bêchers de 200, 500 et 1000 ml,
- ❖ Erlenmeyers,
- ❖ Tubes à hémolyse en plastique (5ml),
- ❖ Micropipette (200 µl) et (1000 µl),
- ❖ Burette,
- ❖ Anse de platine,
- ❖ Mortier,
- ❖ Cloches de Durham ...
- ❖ Tubes Eppendorf

II.3. Présentation des régions de la récolte de raisin

Le prélèvement des raisins est réalisé dans les vignobles cultivés dans deux régions algériennes (la région de sidi lakhder de la wilaya de Mostaganem), au mois de Septembre 2023. Les échantillons prélevés sont transportés directement au laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'Université de Mostaganem. Des séries d'isolements et purifications sont réalisés par des repiquages successifs.

II.3.1. La région Abdelmalek Ramdane (Wilaya de Mostaganem)

Géographie et Climat :

La région bénéficie d'un climat méditerranéen avec des étés chauds et secs et des hivers doux et humides. Ce climat est idéal pour la culture de la vigne, car il permet une maturation optimale des raisins avec une bonne concentration en sucre et en arômes.



FigureN°06 : Vignobles de la plaine de Sidi Lakhder (Wilaya deMostaganem).

II.4. Sources de prélèvement des levures

Les grappes de raisin de chaque cépage (Cépages Cinsault) est prélevée à partir de 10 parcelles différentes dans les vignobles des régions de Sidi Lakhder.

Les cépages de raisin soumis à l'étude sont :

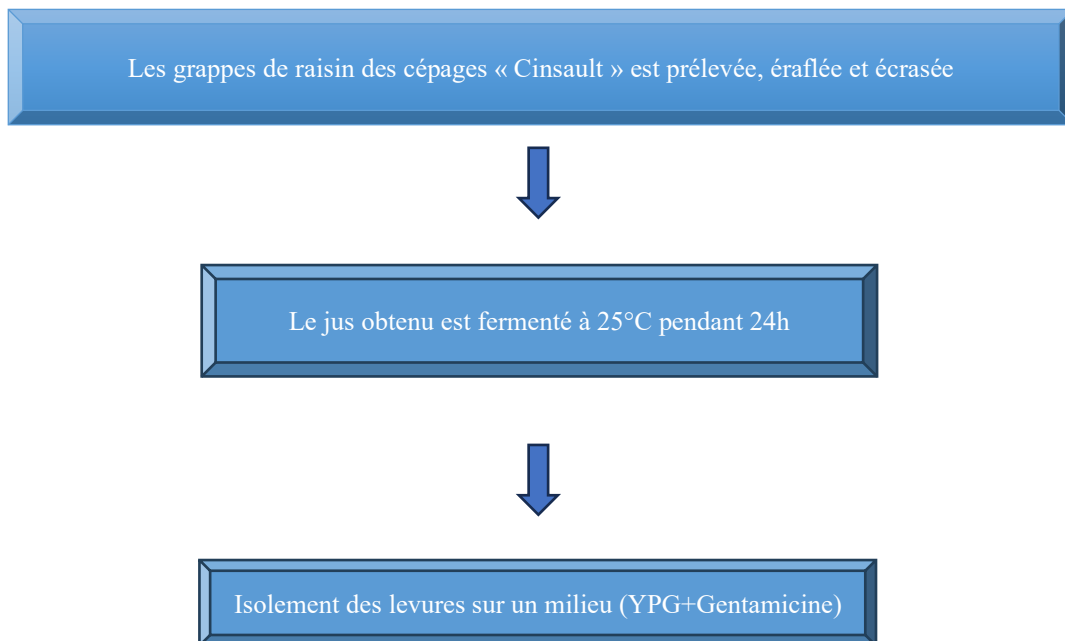
Cépage Cinsault (la région Sidi Lakhder de la wilaya de Mostaganem)

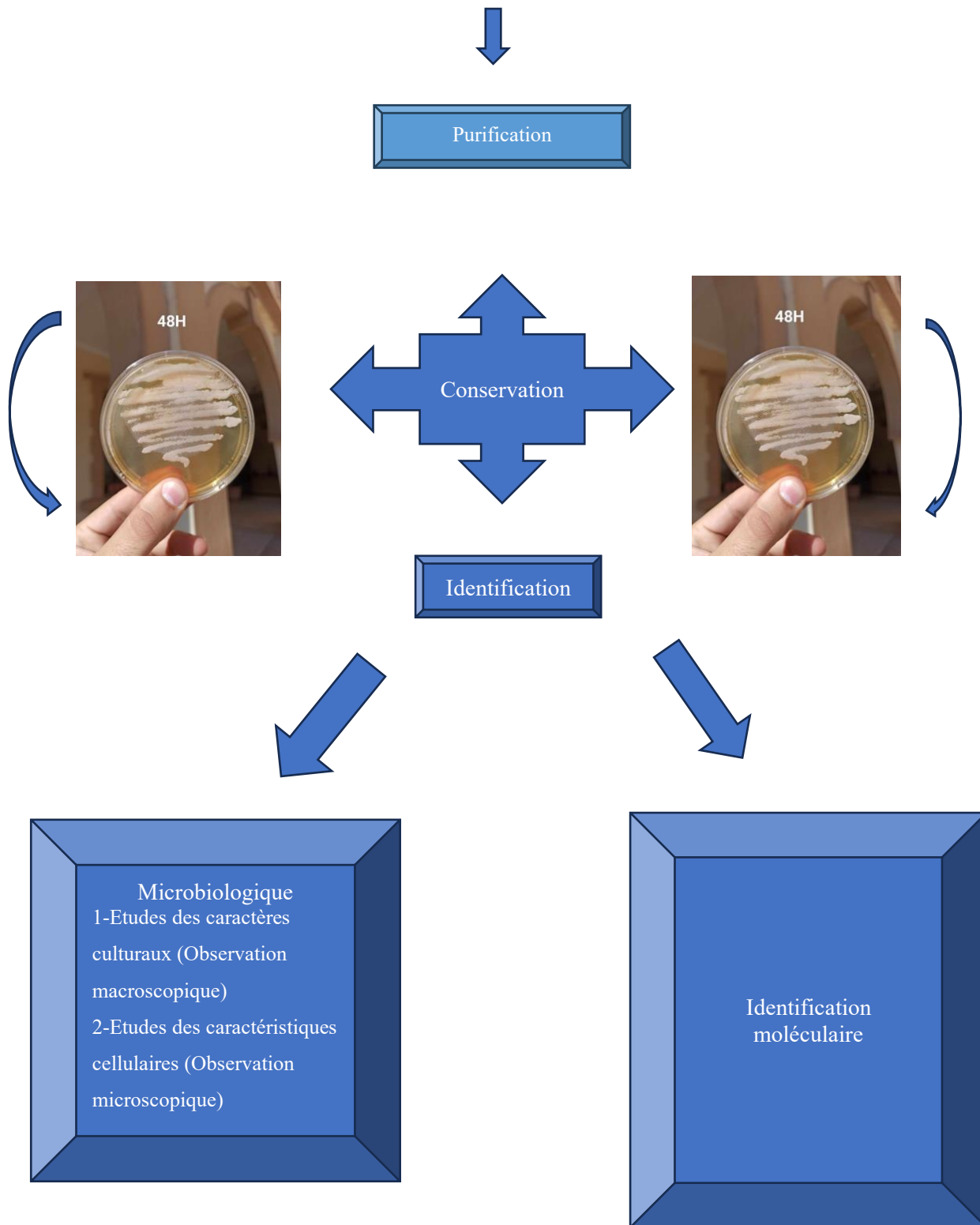
Le Cinsault est un vieux raisin noir au jus blanc, ses grappes sont grandes, composées de grandes baies à la chair très juteuse. C'est un cépage tardif qui a besoin de soleil et résiste bien à la sécheresse, assez productif mais fragile face aux maladies. Il préfère les sols pauvres pour une production de qualité (*I.T.A.F, 2000*). Les grappes de raisin des cépages « Cinsault » est prélevée, éraflée et écrasée.



FigureN°07 : La photo de cépage étudié (Cinsault).

II.5. Isolement, purification et conservation des isolats





II.5.1. Techniques de prélèvement des grappes de raisin

Une quantité d'environ 500 g de grappe de raisins sains ont été prélevés à l'aide de ciseaux stériles, puis recueillis dans des sachets stériles. Les baies de raisin de cépage « Cinsault » sont déposées en boîte de Pétri pour une durée allant de 10 à 12 h, indépendamment sur un lit de

milieu de culture gélosé YPG (2% Glucose, 2% Agar, 1% peptone, 1% extrait de levure) rendu sélectif par l'ajout d'un antibiotique (Gentamicine à 0,5 mg/ml) car en plus des levures, le raisin contient des bactéries et des moisissures (*Vergeade et al., 1976 ; Bouix et Leveau, 1993*). Les baies sont ensuite retirées et les levures censées être présentes sur le raisin s'y installent sur le milieu de culture.

II.5.2. Préparation des extraits de raisin

Les grappes de raisin de cépage sont éraflées et écrasées afin d'obtenir un moût qu'on laisse fermenter pendant une journée à 25°C afin d'augmenter la quantité et la viabilité des levures recherchées (*Renouf et al., 2005*).

II.5.3. Isolement des levures

Cette étape consiste à isoler les levures présentes dans le jus ou le moût de raisin sur un milieu spécifique (YPG+ Gentamicine). A l'aide d'une pipette pasteur flambée, on ensemence par la méthode de stries les boîtes contenant des milieux de cultures avec le jus obtenu ou le moût recueilli à partir de cépage de la 1^{ère} journée de fermentation.

Technique

- Tracer sur le fond extérieur de la boîte de pétri deux diamètres perpendiculaires, la boîte est ainsi séparée en quatre secteurs équivalents.
 - Prélever à l'anse le jus de raisin ou le mout de premier jour de la fermentation en respectant les règles de la stérilité.
 - Étaler l'inoculum en une zone périphérique sur une surface de 1 cm².
 - Flamber l'anse, laisser refroidir, puis disséminer l'inoculum précédemment déposé en l'étalant en stries très serrées sur une moitié de la boîte.
- Faire pivoter la boîte d'un quart de tour, flamber à nouveau l'anse, laisser refroidir, puis tracer à nouveau des stries dans la moitié de la boîte ressemblant les autres quadrants.
- Répéter l'opération afin de disséminer la semence du troisième quadrant dans le quatrième.
 - Avant d'être mises à l'incubation (25°C/1-9 j) en position renversée, les boîtes stériles doivent être soigneusement codées et arrangées.

II.5.4. Purification des levures

Nous avons effectué une série d'ensemencement par la méthode des stries sur des boîtes de culture gélosé (YPG+Gentamicine) dans le but d'avoir des cultures pures.

L'opération est renouvelée en prenant chaque fois au hasard une colonie isolée. Ceci conduit à obtenir une culture dont la pureté est estimée par observation microscopique.

II.5.5. Conservation des levures

Pour une conservation plus longue, les souches levuriennes sont conservées à -18°C dans leur propre milieu de culture avec une solution stérile de glycérol à 25%.

II.6. Études des caractéristiques culturelles

II.6.1. Observation macroscopique

Effectuée directement sur boîte de pétri, cette dernière est liée à de nombreux caractères mentionnés dans le tableau N05 ci-dessous.

Tableau N05 : 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
Autres caractères	La consistance ou l'odeur

II.6.2. Observation microscopique :

- Observation microscopique sans coloration

Ce test sert à déterminer la forme microscopique de la levure et le type de bourgeonnement.

- Observation microscopique après coloration par le bleu de méthylène

Afin de mieux observer la forme des levures et les types de bourgeonnement après une coloration un peu plus spécifique.

- **Méthode de la coloration avec le bleu de méthylène :**

A l'aide de la spatule une colonie est prélevée, puis déposée sur une lame stérile contenant une goutte de solution de bleu de méthylène. La préparation est ensuite recouverte par une lamelle, puis rapidement observée au microscope à l'objectif x40.

II.7. Caractérisation moléculaire des isolats de levures :

Pour la caractérisation moléculaire des isolats de levure, des échantillons ont été isolés à partir des grappes de raisin et cultivés sur des milieux sélectifs. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit **DNeasy Plant Mini Kit** (Qiagen), selon les instructions du fabricant. La concentration et la pureté de l'ADN ont été vérifiées par spectrophotométrie à 260/280 nm (*Sambrook et Russell, 2001*).

La PCR a été réalisée pour amplifier les régions ITS (Internal Transcribed Spacer) et D1/D2 de l'ADNr 26S, connues pour leur utilité dans l'identification des levures (Kurtzman et Robnett, 1998). Les conditions de PCR incluaient une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, d'hybridation à 55°C pendant 30 secondes, et d'élongation à 72°C pendant 1 minute, avec une extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Les produits de PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% et photographiés sous lumière UV (Sambrook et Russell, 2001).

Les bandes d'ADN amplifiées ont été purifiées et séquencées. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles des bases de données publiques en utilisant l'outil BLAST (Altschul et al., 1990) pour identifier les isolats. Cette méthode a permis une identification précise des isolats de *Saccharomyces cerevisiae*.

II.8. Production de la levure boulangère

II.8.1. Préparation du Milieu de Culture

- **Préparation de la Mélasse**

La mélasse est diluée dans de l'eau distillée pour obtenir une concentration finale de 10% (p/v).

Le pH de la solution est ajusté à 5.5 à l'aide de Na OH ou HCl selon les besoins.

Le milieu de culture peut être enrichi avec des sources d'azote (par exemple, du sulfate d'ammonium) et des sels minéraux (par exemple, Mg SO₄, KH₂ PO₄) pour favoriser la croissance des levures.

II.8.2. Stérilisation

- Le milieu préparé est distribué dans des Erlenmeyers stériles (environ 250 ml de milieu dans un Erlenmeyer de 500 ml).
- Les Erlenmeyers sont couverts de bouchons en coton ou de capuchons en aluminium et stérilisés en autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Après stérilisation, le milieu est refroidi à température ambiante.

II.8.3. Inoculation de la Souche

- **Préparation de l'Inoculum**

- La souche de levure conservée est réactivée en l'inoculant dans un milieu YPD frais et en incubant à 30°C jusqu'à l'obtention d'une culture dense.
- Une culture de levure dense (en phase exponentielle de croissance) est utilisée comme inoculum.

- **Inoculation :**

- Un volume approprié de culture de levure (environ 01% du volume total du milieu de mélasse) est ajouté dans chaque Erlenmeyer contenant le milieu stérile.
- Les Erlenmeyers sont ensuite fermés avec des bouchons en coton ou des capuchons en aluminium pour permettre l'échange gazeux.

II.8.4. Fermentation :

- **Conditions de Fermentation :**

- Les Erlenmeyers inoculés sont placés sur un agitateur magnétique avec plaque chauffante réglée à 30°C.
- L'agitation est maintenue à une vitesse de 150-200 rpm pour assurer une bonne aération et homogénéité du milieu.
- La fermentation est réalisée pendant 48 à 72 heures, selon les besoins de l'expérience.

II.8.5. Suivi de la Fermentation

- Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers (toutes les 12 heures) pour mesurer la densité cellulaire (D.O à 600 nm) et le pH.
- Des échantillons peuvent également être analysés pour la concentration en sucres résiduels et la production d'éthanol.

II.8.6. Observation Microscopique

Des frottis de culture sont réalisés et observés au microscope pour vérifier la morphologie des cellules de levure.

II.9. Fin de la Fermentation

II.9.1. Récupération des Cellules

À la fin de la période de fermentation, les cultures sont centrifugées à 4000 rpm pendant 10 minutes pour récupérer les cellules de levure.

Le surnageant est éliminé, et les cellules sont lavées avec une solution saline stérile ensuite séchées.

II.9.2. Conservation des Cellules

Les cellules de levure récoltées peuvent être stockées à court terme à 4°C dans une solution saline stérile ou à long terme dans du glycérol à - 80°C.

Résultats
et
Discussion

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Isolement et purification de la levure

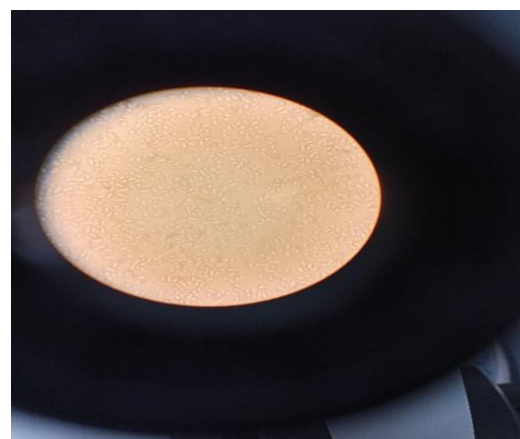
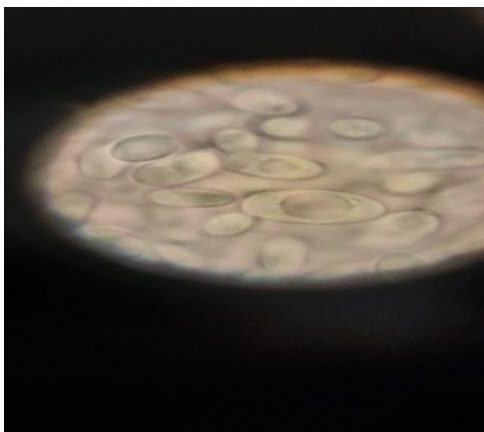
Les échantillons de raisins prélevés ont permis l'isolement de souches de *Saccharomyces cerevisiae*, identifiées à travers une série d'étapes de purification. Les colonies obtenues sur le milieu YPG supplémenté de gentamicine ont montré des caractéristiques macroscopiques typiques des levures. Une croissance visible a été observée après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, indiquant la présence de levures viables.



FigureN°08 : Dénombrement de la souche *Saccharomyces cerevisiae* sur le milieu YPD à 37°C.

III. 2 Observation Microscopique et macroscopique

- Des frottis de culture ont été observés au microscope.
- Les cellules observées étaient de forme ovale, typique des levures, avec des bourgeonnements visibles, confirmant la présence de levures.



FiguresN°09 : Résultats des tests catalase, coloration de Gram et aspects microscopiques de nos levures.

Les levures isolées présentent une morphologie ovale avec des cellules en bourgeonnement, typiques des *Saccharomyces cerevisiae*, la levure boulangère.

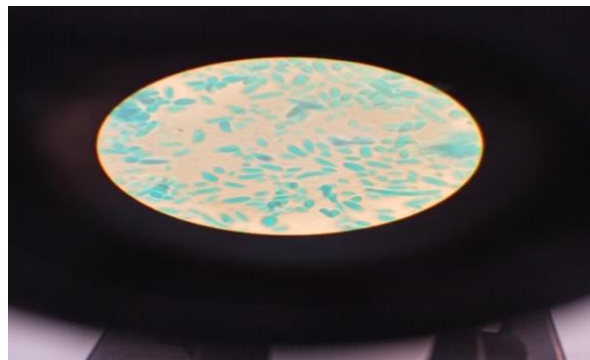
Les caractères macroscopiques des colonies isolées ont été observés sur des boîtes de Pétri. Les colonies étaient rondes, de taille moyenne, avec une surface lisse et une couleur blanche. Ces caractéristiques correspondent bien aux descriptions classiques des colonies de *Saccharomyces cerevisiae* (tableau N°06).

Tableau N°06 : Caractéristique macroscopique de la levure isolées

La forme	Ronde
Le contour	Régulier
La taille	Moyenne
La surface	Lisse
La couleur	Blanche
Autres caractères	Forte odeur de levure

III.3. Identification microbiologique

La coloration de Gram nous a permis de voir que la levure isolée est à Gram positif.



FigureN°10 : Observation microscopique de la levure après coloration de Gram

III.4. Caractérisation moléculaire

L'extraction de l'ADN des isolats a permis la réalisation d'une analyse moléculaire pour confirmer l'identité des souches. Les résultats des PCR et séquençage ont confirmé que les isolats appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

III. 5. Évolution de la fermentation

Le suivi de la cinétique de la fermentation a été fait en mesurant le pH et la densité optique pendant 72 heures.

IV.5.1. Évolution du pH au cours de la fermentation

Les résultats de la cinétique du pH sont présentés sur la figure N°11. Les mesures de pH ont été prises à intervalles réguliers (toutes les 12 heures) pendant toute la durée de la fermentation, afin de surveiller l'acidité du milieu. Les résultats montrent une tendance générale de diminution du pH au cours de la fermentation, indiquant une production d'acides organiques par les levures. Les résultats des mesures de pH montrent une acidification progressive du milieu, ce qui est typique lors de la fermentation alcoolique en raison de la production d'acides organiques. Cette diminution du pH est favorable à la fermentation, car elle inhibe la croissance des bactéries indésirables.

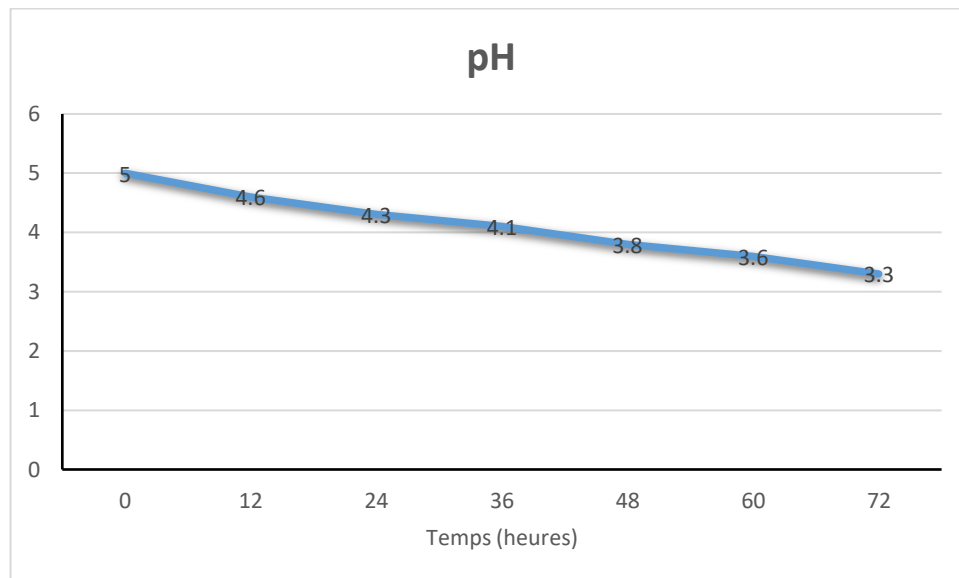


Figure N°11 : Évolution du pH en fonction du temps.

III.5.2. Évolution de la densité optique (DO) au cours de la fermentation

La densité optique à 600 nm (DO600) a été mesurée pour suivre la croissance des cellules de levure pendant la fermentation. Les résultats de l'évolution de la D.O au cours de la fermentation sont illustrés sur la figure N°12. Le graphe montre une augmentation de la D.O en cours de la fermentation. Cette augmentation de la DO indique une augmentation de la concentration en cellules de levure dans le milieu de culture. Les résultats de la DO révèlent

une croissance exponentielle des levures jusqu'à environ 48 heures, suivie d'une phase de ralentissement de la croissance. Cette tendance est indicative d'une phase de croissance active suivie par une phase stationnaire où les ressources du milieu commencent à s'épuiser. Ces données confirment la robustesse de la souche isolée et leur capacité à réaliser une fermentation efficace, ce qui est essentiel pour leur utilisation potentielle dans la production de levure boulangère.

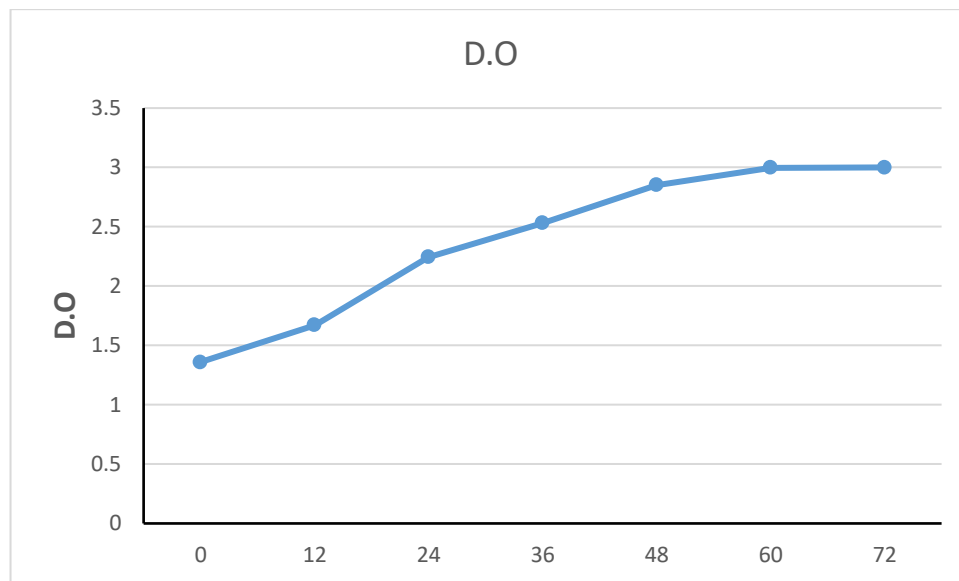


Figure N°12 : Évolution de la densité optique au cours de la fermentation.

III.6. Discussion

L'isolement des levures à partir des raisins de la région de Sidi Lakhdar a été efficace. La méthode de stries successives sur le milieu YPG a permis d'obtenir des cultures pures de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette étape est cruciale pour garantir la pureté des cultures utilisées dans les fermentations industrielles.

Les observations macroscopiques et microscopiques ont permis de confirmer les caractéristiques typiques de *Saccharomyces cerevisiae*. Les colonies rondes, lisses et blanches sont des indicateurs fiables de cette espèce. De plus, la forme et le type de bourgeonnement observés microscopiquement corroborent les identifications précédentes.

L'analyse moléculaire a fourni une confirmation supplémentaire de l'identité des isolats. L'extraction d'ADN suivie de PCR et de séquençage a permis une identification précise,

éliminant ainsi les ambiguïtés possibles dues aux seules observations culturelles et microscopiques.

Les résultats de la fermentation montrent que la souche isolée a une capacité fermentaire robuste. L'augmentation de la densité cellulaire et la réduction du pH sont des indicateurs de la viabilité et de l'efficacité des levures dans un milieu industriel. Ces résultats sont encourageants pour l'application des souches isolées dans la production de levure boulangère.

Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature. Les caractéristiques observées des souches de *Saccharomyces cerevisiae* et leurs performances fermentaires sont similaires à celles décrites par [Renouf et al. \(2005\)](#) et [Bouix et Leveau \(1993\)](#). Ces comparaisons renforcent la validité des méthodes utilisées et des résultats obtenus.

L'étude a permis d'isoler et de caractériser des souches de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de raisins de la région de Sidi Lakhdar. Les souches isolées ont montré des caractéristiques culturelles, cellulaires et moléculaires typiques de cette espèce. De plus, elles ont démontré une capacité fermentaire robuste, essentielle pour leur utilisation dans la production de levure boulangère. Les méthodes utilisées et les résultats obtenus sont conformes aux attentes et aux standards établis, ouvrant la voie à une application industrielle potentielle de ces souches.

Conclusion

Conclusion

La production de levure boulangère, principalement assurée par *Saccharomyces cerevisiae*, joue un rôle crucial dans l'industrie alimentaire, en particulier dans la fabrication du pain, ainsi que dans d'autres industries biotechnologiques telles que la vinification et la brasserie. La levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée pour sa capacité à fermenter les sucres, produisant du dioxyde de carbone et de l'éthanol, processus essentiel à la levée de la pâte et à la production de produits fermentés.

Les levures boulangères sont traditionnellement obtenues à partir de souches industrielles sélectionnées pour leur efficacité et leur capacité de fermentation. Cependant, il existe un intérêt croissant pour l'utilisation de souches indigènes, isolées à partir de sources naturelles comme les raisins, en raison de leur adaptation locale et de leur potentiel à améliorer les caractéristiques organoleptiques des produits finaux.

Dans ce contexte, cette étude a permis d'isoler et de caractériser des souches de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de grappes de raisin, démontrant leur potentiel pour la production de levure boulangère. Les échantillons prélevés ont été efficacement isolés et purifiés, révélant des caractéristiques macroscopiques et microscopiques typiques des levures. Les tests moléculaires, incluant l'extraction d'ADN, la PCR et le séquençage, ont confirmé l'identité des souches, garantissant leur pureté et leur adéquation pour des applications industrielles.

La surveillance de la fermentation sur une période de 72 heures a montré une diminution progressive du pH et une augmentation de la densité optique (DO), indiquant une croissance cellulaire accrue et une activité fermentaire robuste. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés dans la littérature et soulignent l'importance du contrôle des paramètres de fermentation pour optimiser la production de biomasse de levure. Les résultats obtenus montrent que les souches isolées ont une capacité fermentaire robuste, essentielle pour leur utilisation dans la production industrielle de levure boulangère.

En conclusion, cette recherche apporte une contribution significative à la compréhension et à l'optimisation de la production de levure boulangère, offrant des perspectives prometteuses pour des applications industrielles futures. Les souches isolées et caractérisées présentent un potentiel élevé pour améliorer l'efficacité et la durabilité des procédés de production de levure, ouvrant ainsi la voie à des innovations dans le domaine de la biotechnologie alimentaire.

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

- Belin, J. M. (1972). Les levures et leurs applications. Masson.
- Bettane, M., Desseauve, T., & De Lencquesaing, A. (2010). Guide des Vins de France. Éditions Flammarion.
- Blin, J. (2002). Microbiologie appliquée à l'agroalimentaire. Dunod.
- Bonaly, R. (1991). Microbiologie générale et appliquée. Dunod.
- Botton, B. (1991). Les champignons microscopiques : classification, modes de reproduction et rôle dans la nature. Masson.
- Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. Masson.
- Bourgeois, C. M., & Larpent, J. P. (1996). Microbiologie alimentaire : Tome 2 - Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaires. Tec & Doc Lavoisier.
- Cadet, F. (2005). Microbiologie et hygiène des aliments. Tec & Doc Lavoisier.
- Carbonneau, A., Champagnol, F., & Deloire, A. (2007). La Vigne : Physiologie, Terroir, Culture. Dunod.
- Goffeau, A., et al. (1996). Life with 6000 Genes. Science.
- Guiraud, J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Dunod.
- Hidalgo, C., et al. (2005). Enología: Fundamentos y técnicas. Mundi-Prensa.
- Kreger-Van Rij, N. J. W. (1984). The Yeasts: A Taxonomic Study. Elsevier.
- Labrecque, R. (2003). La microbiologie des aliments : Fondements et applications. Presses de l'Université du Québec.
- Larpent-Gourgaud, J. P., & Sanglier, J. J. (1992). Les levures et leurs applications en biotechnologie. Presses universitaires de France.
- Larpent, J. P. (1991). Fermentation et microflore du pain. Presses universitaires de France.
- Leclerc, H. (1975). Microbiologie alimentaire : Principes et applications. Masson.
- Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1991). Microbiologie du vin et applications biotechnologiques. Lavoisier.
- Lodder, J. (1971). The Yeasts: A Taxonomic Study. North-Holland Publishing Company.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2017). **Brock Biology of Microorganisms**. Pearson.
- Mayer, H. K., Meier-Dörnberg, T., & Jacob, F. (2019). **The role of *Saccharomyces cerevisiae* in fermented foods**. *Food Microbiology*, 15, 85-94.
- Mercier, M. (1997). *Biotechnologie : Concepts fondamentaux et applications*. Presses universitaires de France.
- Miller, J. H. (1983). *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). **Effect of yeast on lactic acid bacteria in a simultaneous saccharification and fermentation bioethanol process**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(1), 23-31.
- Oteng-Gyang, K. (1984). *Biotechnology of Yeast: Fundamental and Applied Aspects*. John Wiley & Sons.
- Oteng-Gyang, K. (1984). *Biotechnology of Yeast: Fundamental and Applied Aspects*. John Wiley & Sons.
- Pol, E. (1996). *Biotechnologie des levures : aspects fondamentaux et appliqués*. Presses universitaires de France.
- Retoumard, J. (2005). *Technologie de la fermentation : Applications industrielles*. Dunod.
- Révy, P. (2005). *Biotechnologie des fermentations : Fondements et applications*. Éditions Tec & Doc.
- Simon, J., & Meunier, J. (1970). *Les levures et leur utilisation industrielle*. Dunod.
- Thuriaux, P. (2004). *Genetics of Yeasts: Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vergeade, P., et al. (1976). *La microbiologie des aliments et ses applications industrielles*. Masson.
- Walker, G. M. (2011). **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley & Sons.
- Leclerc, H., Mossel, D. A. A., & Mondot, J. (1995). *Microbiologie des aliments : Aspects microbiologiques de la sécurité et de la qualité alimentaire*. Tec & Doc Lavoisier.
- Scriban, R. (1984). *Biotechnologie : Principes et applications*. *Technip*.