

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Centre Universitaire – Jijel -
Institut des Sciences de la nature

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

المركز الجامعي - جيجل -

معهد علوم الطبيعة

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme

D' études Supérieure (D.E.S)

EN BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Option

Microbiologie

Thème

**Contribution à l'étude de la cinétique
De croissance de la levure :
Saccharomyces cerevisiae sur milieu
Naturel " le lactosérum "**

Président : HENDIS M.sadek

Promoteur : BOULDJEDRI Mohamed

Examineur : HAMAMES Nouredine

présenté par :

DJIHEL Nadjoua

DEHMECHE Massika

REKROUK Ghania

PROMOTION 2001

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال تعالى :

مَنْ رَفَعَ اللَّهُ الذُّنُوبَ أَهْرَاقُوا
عَنْكَ وَالذُّنُوبَ أَوْتُوا الْعِلْمَ
عَرَجَاتِهِ

صدق الله العظيم

Remerciements

Nous tenons à remercier notre promoteur Mr « BOULDJEDRI MOHAMED » qui nous a apporté l'aide considérable dans l'élaboration de ce mémoire.

Nous remercions également tous les responsables de laboratoire de chimie et surtout M^{elle} KHADIDJA .

Nous remercions aussi les responsables de l'hôpital –JIJEL-

Nos remerciements s'adressent aussi aux responsables de la FAC centrale de Constantine .

Nous remercions aussi toutes les responsables et les enseignants de l'institut de Biologie - JIJEL-

Enfin, nous associons à ces remerciements tous ceux qui ont contribué à réaliser ce travail et particulièrement les membres du bureau d'étude

« Cyber Galaxy » Said et Dounia .

GHANIA , MASSIKA , NEDJOUA

Sommaire

Introduction

Etude Bibliographique

Chapitre I

CARACTERES GENERAUX DES LEVURES.

I-1-DEFINITION DES LEVURES.....	3
I-2-CARACTERES MORPHOLOGIQUES DES LEVURES	3
I-2-1-La forme levure.....	3
I-2-2-La forme pseudo-mycélium.....	5
I-2-3-La forme mycélium.....	5
I-2-4-La sporulation.....	5
I-3-CYTOLOGIE ET ORGANISATION.....	5
I-4-LES CONSTITUANTS DES LEVURES	7
I-5-REPRODUCTION.....	8
I-5-1-multiplication asexuée ou végétative.....	8
5-1-1-Bourgeonnement.....	8
5-1-2-formation d'une paroi transversale.....	9
I-5-2-Reproduction sexuée.....	9
5-2-1-Cycle de vie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
I-6-CLASSIFICATION DES LEVURES	11
a-Les levures Ascomycètes.....	11
b-les levures basidiomycètes	11
c-les levures deutéromycètes.....	11
I-7-CARACTERES D'IDENTIFICATION.	13
a- caractères culturaux	13

b-caractères morphologiques.....	14
c-caractères physiologiques.....	14
I-8- APTITUDE A LA FERMENTATION.	15
I-9-UTILISATION DES LEVURES.	17
a- L'utilisation de la levure pour la panification.....	17
b- Fabrication du vin.....	17
c- Fabrication d'alcool éthylique.....	18
d- Levure aliments.....	18
e- Utilisation de la levure de bière.....	18

Chapitre II

ASPECT BIOCHIMIQUE DES LEVURES.

II-1- METABOLISME DU GLUCOSE CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	20
II-1-1- La voie de la glycolyse.....	21
II-1-2- La voie des pentoses phosphates.....	21
II-1-3- Cycle de Krebs.....	24
II-2- REGULATION DU METABOLISME CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ..	26
II-2-1-Métabolisme respiratoire du glucose.	26
2-1-1- Effet pasteur.	26
II-2-2- Métabolisme fermentaire du glucose.....	27
2-2-1- La répression catabolique ou effet crabtrée.	27
II-2-3- Métabolisme respératoire de l'éthanol.	27
II-2-4- Influence de métabolisme secondaires.....	28
2-4-1- Effet de l'éthanol.	28
2-4-2- Autre métabolismes secondaires.	30

Chapitre III

DECHETS INDUSTRIELLES UTILISES POUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE.

III-1- LA MELASSE.....	32
III-1-1- Définition.	32
III-1-2- Mélasse de canne à sucre.	32
III-1-3- Mélasse de betterave.....	33.
III-2- MILIEU NATUREL A LA BASE DE GHARS.	34
III-3- LE LACTOSEROM	36
III-3-1- Généralité.	36
3-1-1 Définitions.	36
• Définition technologique.	36
• Définition nutritionnelle.	36
3-1-2- sources industrielles du lactosérum.	36
a-La beurrerie.	36
b-La fromagerie.	36
3-1-3- caractéristiques de lactosérum.	38
a-Le lactosérum doux.	38
b-Le lactosérum acide.	38
3-1-4- propriétés de l'lactosérum.	38
III-3-2- Etude quantitative et qualitative de lactosérum.	38
3-2-1- Le lactose.	39
3-2-2- Les protéines.	39
3-2-3- Les sels minéraux.	40
3-2-4- Les vitamines.	41
III-3-3- Produit de fermentation à partir de lactosérum.....	41
3-3-1- Le lactosérum : substrat de fermentation.	42

3-3-2- Production de levure sur lactosérum.	42
III-4- CROISSANCE DES LEVURES.	42
III-4-1- Facteur de croissance des levures.	43
4-1-1- Besoins nutritionnels.	43
4-1-2- Influence de l'environnement.	45
III-4-2- Cinétique de croissance de <i>saccharomyces cerevisiae</i>	46
4-2-1- croissance en discontinue (batch).	46
4-2-2- croissance en continue.	47
4-2-3- cinétique de croissance en discontinue.	49

Etude Expérimentale

Chapitre IV

MATERIEL ET METHODES

IV-1- MATERIEL.	50
IV-2- METHODES DE TRAVAIL.	51
IV-2-1- Estimation de la biomasse.	51
a-Etalonnage de l'appareil.	51
b-Dénombrement des cellules.	51
IV-3- SUIVI DE CROISSANCE.	52
IV-3-1- Mesure de la croissance.	52
IV-3-2- Determination du PH.	52

Chapitre V

RESULTATS ET DISCUSSION

V-1- FERMENTATION SUR MILIEU NATUREL A BASE DE LACTOSERUM.	54
V-2- FERMENTATION SUR MILIEU SYNTHETIQUE A BASE DE GLUCOSE.	56
V-3- DISCUSSION.	58

Conclusion

Bibliographie

Abréviation

µm : micromètre .

AMP : Adénosine Mono-Phosphate .

ATP : Adénosine Tri-Phosphate.

(NAD , NADH+ H⁺) : Nicotine Adénine Di-nucléotide (oxydée , réduite)

ADP : Adénosine Di-Phosphate .

CO₂ : Dioxyde de Carbone .

ADN : Acide Désoxy ribo-Nucléique .

ARN : Acide Ribo-Nucléique.

(NADP, NADPH) : Nicotinamide Adénine Di-nucléotide Phosphate (oxydée, réduite).

(FAD , FADH₂) : Flavine Adénine Di-nucléotide (oxydée , réduite).

QR : Quotient Respiratoire .

O₂ : Oxygène .

PH : Potentiel d'hydrogène .

D.O : Densité Optique.

nm : nanomètre .

h : heure .

mn : minute .

% : pourcentage .

C.N.R.S : Centre Nationale de la Recherche Scientifique.

INTRODUCTION

La fermentation est la plus ancienne des procédures biotechnologique , elle est donc aussi vieille que l'agriculture.

De puis la plus haute antiquité, les hommes (égyptiens et semeriens) utilisent à leur profit sans savoir et de façon empirique l'activité fermentaire des microorganismes , ce ci a été possible grâce à l'omniprésence de ces microorganismes dans la nature ,en réalité c'est par millions que les levures vivent sur la peau, des grains de raisin et des fruits ;donc un simple pressage des grains de raisin suffit a mettre en contact les levures avec les sucres des fruits. Mais il fallut attendre le milieu du XIX siècle pour que ces fermentations soient étudiées scientifiquement par **Pasteur** qui ainsi démontra que la fermentation alcoolique a partir des sucres simple est un phénomène d'activité microbienne dont l'agent responsable est une levure qui appartient au genre *Saccharomyces* ,qui signifie littéralement champignon du sucre ; par la suite de nombreuses études se rapportant aux microorganismes et leurs utilisation industrielle ont permis l'extrapolation rationnelle des procédés de laboratoire à l'échelle industrielle , ainsi à la fin du XIX siècle ,il y'a une production de la levure de boulangerie en cuve profonde et aérée.

Aujourd'hui , et dans le domaine de la biotechnologie , la levure franchit une étape importante de domestication , par croisement ; sélection et amélioration génétique , elle demeure alors une usine susceptible de produire des substances destinées à l'industrie pharmaceutique , agro-alimentaire...etc.

Une question importante en biotechnologie est de savoir si l'on peut diversifier les substrats de production de biomasse des levures, toutes en conservant la rentabilité économique , à cet effet ce sont seuls les substrats abondants et bon marché seront retenus.

En effet l'industrie agro-alimentaire génère d'importante quantités de déchets a savoir : mélasse de betterave, de canne à sucre, des déchets de datte , de lactosérum ...etc. Ces déchets riches en sucres et substances carbonées , peuvent être valoriser par leur

utilisation comme substrat pour la production de biomasse des levures . C'est dans ce contexte que se fixe l'objectif de notre travail , qui vise la valorisation d'un sous produit de fromagerie « le lactosérum » pour la production de biomasse de levure du type *Saccharomyces cerevisiae*.

Notre étude est présentée en deux parties :

- Dans la première partie : une revue bibliographique sur les levures .
- Dans la deuxième partie : présentation des résultats de suivi de croissance de *saccharomyces cerevisiae* sur milieu naturel a base de lactosérum .

On termine par une conclusion générale .

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

CARACTERES GENERAUX DES LEVURES

Chapitre I

Caractères généraux des levures

I-1-Définition des levures :

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires immobiles présentant une structure cellulaire eucaryote, leur seule caractéristique commune est l'état unicellulaire bien que de nombreuses levures soient aussi capables de faire dans certaines conditions (le milieu pauvre en substrats nutritifs : milieu maïs, Agar et à une température de 25°C) un pseudo-mycélium comme le genre *Brettanomyces*, voire un véritable mycélium comme *Candida albicans* [31;41].

Les levures sont largement distribuées dans la nature, elle se rencontrent fréquemment dans le sol ou dans l'air, et affectionnent les milieux fortement concentrés en sucre tels les sirops, le miel, les fleurs, les fruits (pommes, raisins, prunes) [20;26].

I-2-Caractères morphologiques des levures :

La morphologie de ces microorganismes est très variée. Il faut distinguer la forme levure, le pseudo-mycélium et le mycélium [4].

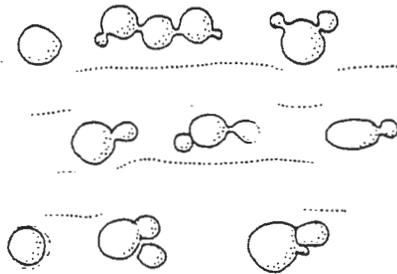
I-2-1/ La forme levure :

C'est le plus simple des appareils végétatifs. Il se présente sous forme de cellules uniques libres indépendantes ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir : sphérique, ovoïde, cylindrique, apiculée, en bouteille, pyramidale (*voir figure1*) [4].

La taille des cellules de levure est très variable suivant les espèces : 1 à 10µm de large contre 2-3µm ou 20.50µm de longueur [8]. Les dimensions et l'aspect peuvent varier considérablement, en fonction de l'environnement, du milieu de culture, et de l'âge des cellules [27].

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les cellules végétatives habituellement libres et isolées sont immobiles, rigides, de forme globuleuses (sphérique), ovoïdes ou dans certaines conditions physiologiques (exemple : exigence en facteurs de croissance)

Sphérique

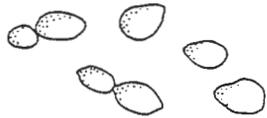


ex : *Saccharomyces cerevisiae*

Hansenula anomala

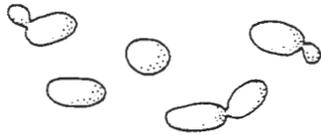
Cryptococcus neoformans

Ovoïde



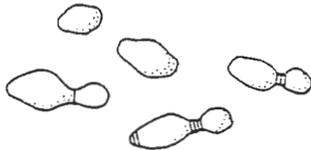
ex : *Dekkera bruxellensis*

Cylindrique



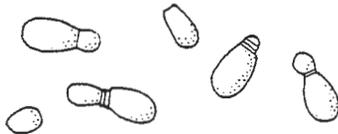
ex : *Pichia membranaefaciens*

Apiculé



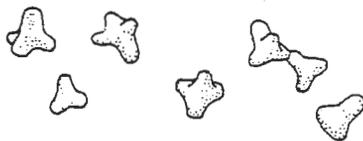
ex : *Kloeckera apiculata*

Bouteille



ex : *Pityrosporum ovale*

Triangulaire ou pyramidal



ex : *Trigonopsis variabile*

Figure 1 : aspects morphologies des levures.

plus ou moins allongées en hyphes rudimentaires. Au terme de chaque bourgeonnement les cellules peuvent rester attachées les unes aux autres et former un pseudo-mycélium [22;39].

I-2-2/ La forme pseudo-mycélium :

Il est fréquent d'observer chez certaines espèces, lorsque, après bourgeonnement, les cellules filles restent associées les unes aux autres, conduisant ainsi à l'apparition de chaînettes constituées de plusieurs cellules. Il s'agit d'un pseudo-mycélium qui peut être rudimentaire ; c'est-à-dire ne compter que 4 à 5 cellules, il peut être aussi plus important, bien formé, et comporter des ramifications. La production de certains pseudo-mycélium est favorisée par l'anaérobiose [4].

I-2-3/ La forme mycélium :

Certaines espèces des levures ont la propriété de donner un vrai mycélium séparé par des cloisons ou septa. Cette différenciation résulte d'un allongement important des cellules. L'hyphe ainsi formée prolifère par une croissance apicale. Dans la majorité des cas les levures donnent un pseudo-mycélium qui se transforme en mycélium, mais il existe des espèces chez lesquelles les levures donnent directement un filament sans passer par le stade pseudo-mycélium cas de *Endomycopsis capsularis* [4].

I-2-4/ La sporulation :

Lorsque le milieu ambiant est défavorable, les levures ascomycètes, outre la possibilité de se différencier en hyphes, peuvent produire des spores ; le phénomène de la sporulation s'observe tant sous la forme unicellulaire que sous la forme mycélium et confère alors aux cellules un aspect souvent utile en taxonomie, toute fois, même au sein d'un mycélium, les spores ne s'élaborent pas d'une manière disparate mais en principe à partir d'une même cellule [4].

I-3-Cytologie et organisation :

La cellule de levure (voir figure 2) est limitée par une paroi d'épaisseur de 150 à 230 nm, riche en polysaccharides antigéniques, en chitine, en protéines dont certaines

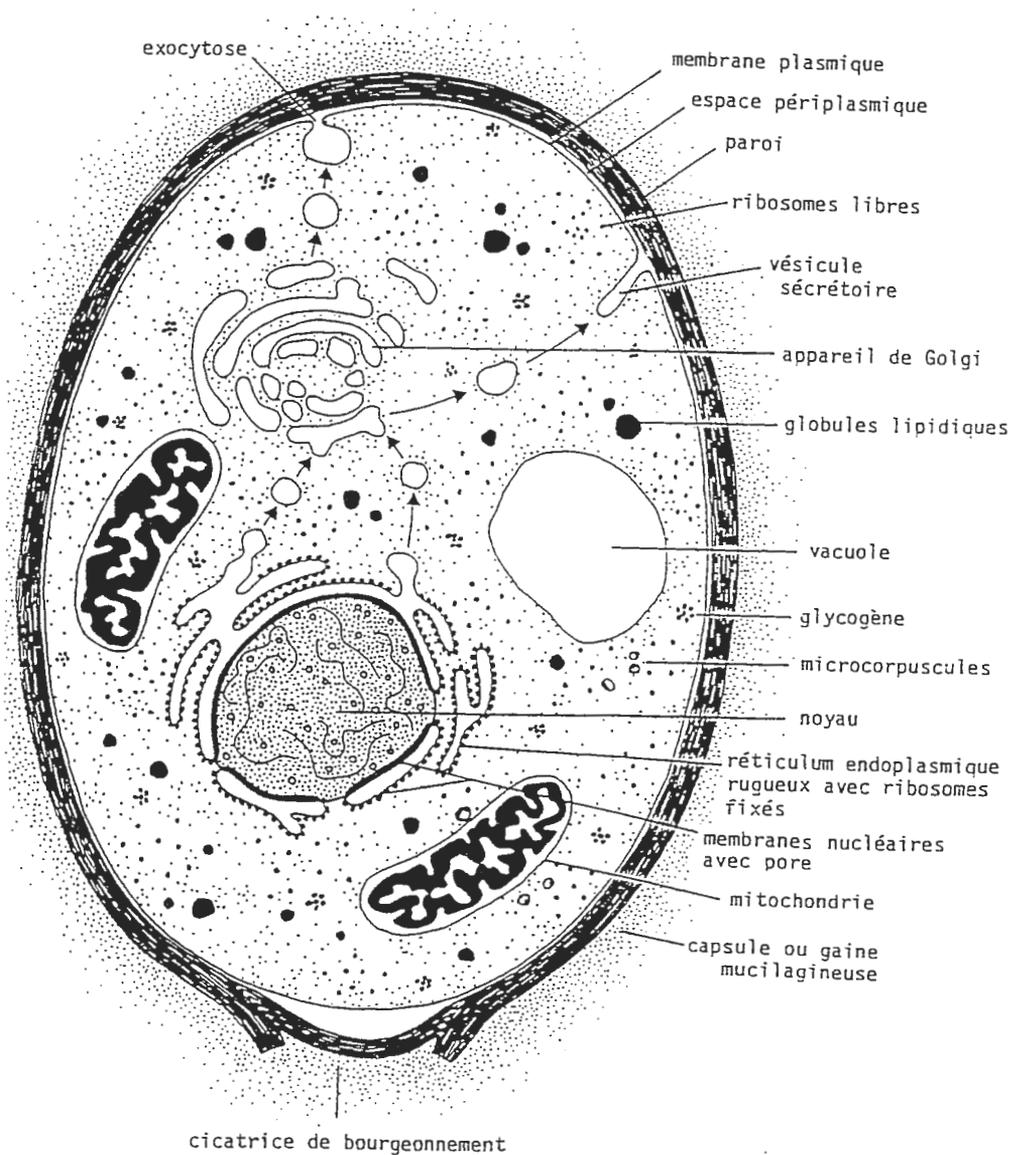


Figure 2 : Schéma d'une cellule de levure [5].

sont des enzymes. La membrane plasmique d'épaisseur moyenne est de 7,5nm qui constituée des stérols (protéines et lipides). Le cytoplasme contient des vacuoles, des ribosomes et des mitochondries. Ces derniers sont la centrale énergétique des cellules. Le noyau est limité par une membrane, et contenant des chromosomes [1 ;18;50].

I-4-Les constituants des levures :

L'efficacité nutritionnelle d'un produit dépend de sa composition chimique de ses constituants. La levure-aliment est caractérisée par une forte teneur en protéines , acides nucléiques, en vitamine du groupe B, en glutation et en choline. D'après **Vrignaud(1991)**, la composition moyenne d'une levure est la suivante [13] :

a- Fraction protéique :

La levure à une teneur moyenne en protéines de 50%. Elle est riche en acides aminés indispensables dont la lysine.

b-Les lipides :

Ils représentent 5 à 8% des constituants de la levure ; ils ont une composition proche de celle du lait. La proportion d'acides gras poly- insaturés , stimulants des fonctions hépatiques, est de 10%.

c-Les glucides :

Les glucides représentent 26 à 29% des constituants de la levure. Il s'agit principalement de mannose, de galactose et de glucose.

d- Les vitamines :

Les levures constituent une source importante de vitamines du groupe B mais aussi de vitamines E, D₂ et C.

e- Les sels minéraux :

Les matières minérales représentent 6,5 à 8,5. Elles sont sous forme assimilable par le consommateur et contiennent une partie d'oligo-éléments nécessaires à l'activité enzymatique et à l'efficacité des vitamines.

f- Les acides nucléiques :

100g de levures sèches à 50% de protéines contiennent 3 grammes d'acides nucléiques . La viande a une teneur de 0,9 à 1 grammes d'acides nucléiques par

100 grammes. Par rapport à la quantité de protéines, les teneurs en acides nucléiques des levures et de la viande sont donc très voisines.

I-5- Reproduction :

Chez les organismes unicellulaires, la croissance correspond à l'augmentation du nombre des individus ; elle est donc liée à la reproduction [18].

Les levures peuvent représenter deux modes de reproduction :

I-5-1 Multiplication asexuée ou végétative :

C'est la voie de prolifération la plus fréquente chez les levures. Il faut distinguer, d'une part la multiplication par bourgeonnement, et d'autre part, par formation de parois transversales à l'intérieure des éléments unicellulaires et les hyphes (la scissiparité) [2;4].

5-1-1 Bourgeonnement :

Le bourgeonnement représente le mode de reproduction végétative le plus courant chez les levures. (*Voir figure 3*) . A l'exception de quelques genres (*Geotrichum candidum*) [22]. Les sites d'apparition des bourgeons laissent à la surface des cellules mères des cicatrices typiques observables au microscope électronique [4].

Il existe différents types de bourgeonnement selon les formes des cellules .

Lorsque la levure est sphérique, le bourgeonnement dans la majorité des cas, réparti sur toute la surface cellulaire, il s'agit d'un bourgeonnement multilatéral ou multipolaire. Cas de *Saccharomyces cerevisiae*, il est possible de dénombrer jusqu'à 20 cicatrices bien visibles [4].

Chez les levures apiculées (*Kloekera, Hanseniaspora Saccharomyces*), le bourgeonnement est bipolaire [4].

Les levures sous forme de bouteille (genre *pityrosporium*), le bourgeonnement est strictement mono-polaire [4].

Dans le genre *Sterigmatomyces*, la levure mère produit de fins filaments de 1,5 à 30µm de long appelé stérigmate. Au bout de ce filament se développe une cellule fille qui à son tour, donne naissance à un stérigmate portant une deuxième

cellule fille. Les cellules filles se sépareront par formation d'un septum dans la zone centrale du stérigmate [4].

L'examen d'une population levurienne en phase stationnaire montre que la majorité des cellules n'a pas de cicatrice de bourgeonnement, une minorité en présente 1 à 6 voire 12 à 15 (Miller,1983). Dans des conditions de milieu favorables, le temps de génération de *Saccharomyces cerevisiae* est de 1,5 à 2h [8].

5-1-2 Formation d'une paroi transversale :

Observer chez les levures unicellulaires du genre *Schizosaccharomyces*, et chez les cellules filamenteuses par formation d'une cloison transversale(septum) [4].

I-5-2- Reproduction sexuée :

La reproduction sexuée n'existe pas toujours chez toutes les espèces, elle se fait par la conjugaison entre deux cellules de type conjuguant opposée haploïdes donnant un zygote diploïde, qui par l'intermédiaire d'une méiose forme des spores haploïdes [18;38].

5-2-1 Cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae* :

La figure 4 résume le cycle de reproduction sexuelle de genre *Saccharomyces cerevisiae*, il comprend une phase de reproduction végétative par bourgeonnement typique, où la reproduction végétative se fait par septation monocellulaire.

Le passage à la diplophase se fait par conjugaison sexuelle entre deux cellules de type conjuguant opposé, qui forment une cellule transitoire, le zygote. Ce dernier se reproduit végétativement sous forme de cellule diploïde, qui peuvent retourner à l'haplophase par méiose et sporulation.

La diplophase est très stable chez *Saccharomyces cerevisiae* où la sporulation est restreinte à des milieux définis, riches en acétate pauvre en nutriments [38].



Figure 3 : cellule de *Saccharomyces cerevisiae* en bourgeonnement $\times 370000$ [31].

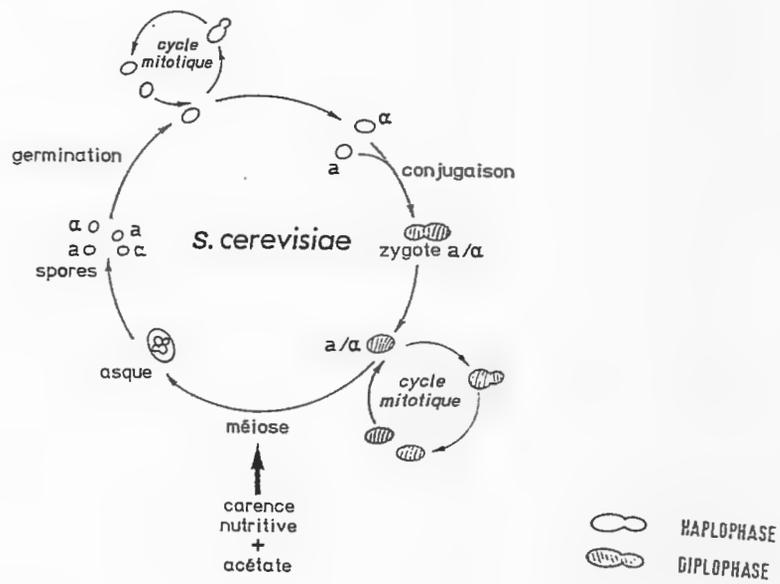


Figure 4 : Cycle biologique de *Saccharomyces cerevisiae* [23].

I-6- Classification des levures :

Les levures ne forment pas un groupe systématique homogène du point de vue taxonomique, selon **Kreger-vanrij (1984)**. IL existe 60 genres et 500 espèces, repartis dans les trois groupes de champignons supérieurs :les ascomycètes, des basidiomycètes et les deutéromycètes (champignons imparfaits) constitués de plusieurs familles (*voir tableau 1*) [8;21].

On distingue des "levures vraies", celles produisent des spores encore appelées "levures sporogènes" et levures imparfaits (levures fausses) ne produisent pas de spore.

Le premier cas ce sont des hémiascomycètes (levures ascosporegènes) soit des basidiomycètes (levures basidiosporogènes). Le second cas ce sont des deutéromycètes [31].

a- Les levures Ascomycètes :

Forment la famille de Saccharomycetaceae divisé en quatre sous familles [18].

b- Les levures basidiomycètes :

Forment la famille des Sporobolomycetaceae qui contient peu d'espèces [18].

c- Les levures deutéromycètes :

Constituent la famille des Cryptococcaceae qui est divisée en quatre sous familles [18].

Tableau 1 : classification des levures [3].

Division	Amastigomycota							
Sub-division	Ascomycotina			Basidiomycotina		Deutéromycotina		
Classe	Ascomycètes			Basidiomycètes		Blastomycètes (Deuteromycètes)		
Sous classe	Hémiascomycètes							
Ordre	Endomycetales			Ustilaginales	Trémellales			
Famille	Spermophthoraceae	Saccharomycetaceae			Filobasidiaceae	Levures formant des Teliospores *Sirobasidiaceae *Trémellaceae	Cryptococcaceae	Sporobolomycetaceae
Sous famille		Schizosaccharomycetoideae	Nadsonioideae	Lipomycetoideae	Saccharomycetoideae			
Principaux Genres	<i>Coccidiascus</i> <i>Metschnikovia</i> <i>Nematospora</i>		<i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsomia</i> <i>Saccharomycodes</i> <i>Wickerhamia</i>		<i>Citeromyces</i> <i>Clavispora</i> <i>Debaromyces</i> <i>Hansunela</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomy-copsis</i>	<i>Chionosphaera</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i>	<i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospordium</i> <i>Brettanamyces</i> <i>Candida</i> <i>Gryptococcus</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Sterigmatomyces</i>	<i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i>

La classification du genre *Saccharomyces cerevisiae* est représenté sur le tableau2

Tableau 2 : classification de *Saccharomyces cerevisiae* [3]

Division	Sub-Division	Classe	Sous Classe	Ordre	Famille	Sous Famille	Genre	Espèces
Amastigomycota	Ascomycotina	Ascomycètes	Hémiascomycètes	Endomycetales	Saccharomycetaceae	Saccharomycetoïdeae	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

I-7- Caractères d'identification:

L'identification des levures fait appel à des caractères cultureux et morphologiques, à la sexualité et a des critères physiologiques [18].

a-Caractères cultureux :

Il s'agit d'examiner l'aspect des cultures en milieu liquide et sur milieu solide après incubation à 28 °C pendant 3 jours ou plus.

- Croissance en milieu liquide :

Les cultures peuvent être effectuée sur les milieux suivants :

- Milieu à l'extrait de malt (2%) liquide.
- Milieu Glucose –Extrait de malt – Peptone.

L'aspect des cultures est noté :

- Formation des sédiments au fond du tube et aspect (Fin, grossier).
- Pellicule en surface .
- Formation de gaz .

- Croissance sur milieu solide :

Les cultures sont effectuée sur les même milieux que précédemment, gélosés à 2% ou sur milieu YM (yeast morphology Agar, Difco), conditionnés en boîte de pétri ou en tube incliné. L'ensemencement se fait en série en surface.

L'observation de la culture permet de définir : La taille des colonies, leur forme, leur aspect et leur pigmentation [7;27].



Les *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être mis en évidence sur les milieux WLM ou WLD (wallerstein nutrient ou wallerstein differential) contenant du vert de bromocresol.

Les boîtes ensemencées sont incubées à 25 °C 3 jours, seules les souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont incapables de réduire le colorant et forment des colonies lisses [18].

b- Caractères morphologiques :

Les caractères morphologiques permettent de définir le genre des levures est peuvent être notés à l'examen microscopique :

- Forme et tailles des cellules végétatives isolées
- Les modes de reproduction.
 - Bourgeonnement ; formation d'un pseudo-mycélium, fission transversale (reproduction asexuée).
 - Existence d'une sporulation : les levures ayant une reproduction sexuée sont sporogènes.
 - Les levures non sporogènes.
- Organisation des cellules (pseudo mycélium, vrais mycélium) [27;34;35].

c- Caractères physiologiques :

- Activités biochimiques.
 - utilisation de divers substrats carbonés.
 - Pouvoir fermentaire.
 - Exigences en facteurs de croissance (PH, température.....).
 - D' autres caractères peuvent être étudiés :
 - la recherche d'une uréase à 37 °C (par exemple , en bouillon Difco. Bacto-urea R) [35].
 - la résistance à 0,1% ou 0,01 % de cycloheximide(ou actidione).
 - La détection de la production de composés polysaccharidiques extracellulaires, après culture en présence d'un sucre par le liquide de lugol.
 - L' assimilation du nitrate de potassium comme seule source d'azote [3].
- Ces caractères permettent de déterminer l'espèce dans chaque genre [27].

On peut noter que la classification des levures dans ces dernières années, comme en bactériologie est basée sur les techniques de chimiotaxonomie (par exemple analyse des composants de la paroi cellulaire), ainsi que par la composition de l' ADN nucléaire en base [3].

Les caractères morphologiques et physiologique des principaux genres des levures ascomycètes représentés sur le tableau 3 .

I-8- Aptitude à la fermentation :

Elle est étudiée à l'aide du milieu liquide de WICKERHAM qui contient un indicateur coloré, ce milieu est reparti en tubes à essai à raison de 9 ml par tube et chaque tube reçoit une cloche de Durham, les tubes reçoivent stérilement 1 ml de solution de sucre à 20% (ou 40% pour le raffinose) [19].

Dans un premier temps la fermentation de glucose est étudiée. En cas de résultat positif les sucres suivants sont utilisés : galactose, Saccharose, maltose, melibiose, raffinose, tréhalose, melizitose, cellobiose, émuline, amidon, lactose. En cas de résultat négatif avec le glucose il n' est pas nécessaire d' étudier les autres sucres. Par ce que une souche ne fermentant pas le glucose ne fermente aucun autre glucide [19].

Après ensemencement les tubes sont mis à incuber 28 °C après 3 jours la culture examinée, la fermentation positive se traduit par une culture abondante accompagnée d' un dégagement de gaz dans la cloche, et un virage au jaune de l'indicateur coloré [19].

On peut noter que l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ne fermente pas le maltose car elle ne possède pas d' α -amylase , aussi que le lactose car elle ne possède pas le lactase et β - galactosidase [6;11;15] .

Tableau 3 : caractéristiques des principaux genres de levure ascomycètes [4]

Caractères Genres	Pseudo-mycélium	Mycélium	Ascospores		Forme de L'asque	Fermentation	Uréase	Test au Lugol	Nitrates (Utilisation)
			Nombre par asque	Libérées de L'asque					
<i>Arthroascus</i>	-	+	1-4	+	« chapeau » ou « saturne »	-	-	-	-
<i>Cyteromyces</i>	-	-	1-2	-	Sphérique	+	-	-	+
<i>Clavispora</i>	v	-	1-4	+	Conique	+	-	-	-
<i>Debaromyces</i>	v	-	1-4	-	Sphérique ou boule	v	-	-	-
<i>Dekkera</i>	+	-	1-4	+	« chapeau »	+	-	-	v
<i>Hanseniaspora</i>	v	-	1-4	v	« Chapeau » ou Sphérique avec ou sans saillie	+	-	-	-
<i>Hansenula</i>	v	v	1-4	v	« Chapeau », « Saturne » ou hémisphérique	v	-	-	+
<i>Issatchenkia</i>	+	-	1-4	-	Sphérique	+	-	-	-
<i>Kluyveromyces</i>	v	-	1	+	Sphérique, ellipsoïde reniforme, ou en croissant	+	-	-	-
<i>Metschnikovia</i>	v	-	1-2	v	Epingle	v	-	-	-
<i>Pachysulen</i>	v	-	4	+	« chapeau »	+	-	-	+
<i>Pichia</i>	v	v	1-4	+	Sphérique, hémisphérique « chapeau » ou « saturne »	v	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	v	-	1-4	-	Sphérique ou ovale	+	-	-	-
<i>Saccharomycopsis</i>	+	+	1-4	v	Sphérique « chapeau » ou « saturne »	v	-	-	-
<i>Schizosaccharomyces</i>	-	v	2-8	+	Sphérique, ellipsoïde ou réniforme	+	+	-	-
<i>Stephanoscyus</i>	+	+	1-4	-	Hémisphérique	-	-	-	-
<i>Toralospora</i>	v	-	1-4	-	Sphérique ou ellipsoïde	-	-	-	+
<i>Wickerhamiella</i>	-	-	1	+	ellipsoïde	-	-	-	+
<i>Zygosaccharomyces</i>	v	-	1-4	-	Sphérique ou ellipsoïde	+	-	-	-

V : variable

+ : positif

- : négatif

I-9- Utilisation des levures :

les levures représentent certainement le groupe le plus important de microorganismes 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.

Ces microorganismes sont aussi largement utilisés dans divers secteurs de la recherche biomédicale et des biotechnologies.

Ainsi, des levures modifiées génétiquement produisent l'antigène de surface du virus de l'hépatite B utilisé dans le vaccin anti-hépatite. D'autre produisent le sérum-albumine humaine.

En fin, leur rôle historique d'auxiliaires dans le domaine de l'agroalimentaire ne s'est pas démenti et elles interviennent encore de nos jours dans la fabrication de nombreux produits alimentaires destinés à l'homme (bière, vin, saké, pain etc. ...) ou aux animaux (protéines d'organisme unicellulaires ou P.O.U) [31;41].

Saccharomyces cerevisiae est la principale espèce utilisée par l'homme , elle effectue la fermentation alcoolique dont les produits terminaux sont l'alcool éthylique et le gaz carbonique [35].

a- L'utilisation de la levure pour la panification :

Le pain est le résultat d'une fermentation alcoolique par *Saccharomyces*, qui est utilisé comme levain [2].

Pour fabriquer le pain, la farine la plus utilisée est celle de blé, elle contient entre 1 et 2 % de sucres (surtout glucose et fructose) qui sont fermentés par la levure, le gaz carbonique généré assure l'aspect vacuolisé de la mie, par sa dilatation, et l'éthanol est éliminé par évaporation. La levure assure la production d'autres composés qui donnent de l'arôme et hydrolyse d'autres composés qui donnent sa texture au pain [46].

b- Fabrication du vin :

Elle utilise la fermentation des sucres solubles contenus dans le jus de raisin. Les levures à vin *Saccharomyces cerevisiae* variété ellipsoïdes, se trouvent sur les grains de raisin murs. La fermentation peut se produire spontanément ou être déclenchée avec du moût d'une fermentation précédente [14;34;35].

c- Fabrication d'alcool éthylique :

L' alcool éthylique est un produit industriel très important, obtenu par distillation de substances végétales fermentées. On utilise alors les matières premières les moins coûteuses : pommes de terre, betterave, mélasse. Les souches de levures proviennent de levures utilisées en brasserie, sélectionnés progressivement par les distillateurs [34;35].

d- Levure aliments :

Leur production utilise des sous produits industriels (alcanes méthanol) des résidus agricoles ou d'industries agro-alimentaires (lactosérum, mélasse) [35].

e- utilisation de la levure de bière :

la levure de bière, riche en protéine, vitamines, minéraux , est considérée comme un aliment de haute valeur nutritive dont les effets thérapeutiques sont confirmés par des recherches scientifiques année après années . elle agit comme un vecteur vitaminique pour les carences ou les pré-carences de notre métabolisme. La levure de bière aide également à reconstituer la flore intestinale. A ce but, on l'utilise en même temps ou après la prise d'antibiotiques, ou suite à des troubles intestinaux (diarrhée ou constipation).

Elle a une action sur la peau, les cheveux et les ongles, ainsi que pour la furonculose, l' acné et l'eczéma. [14;45]

La figure 5 représente les différents domaines d'utilisation de la fermentation des levures.

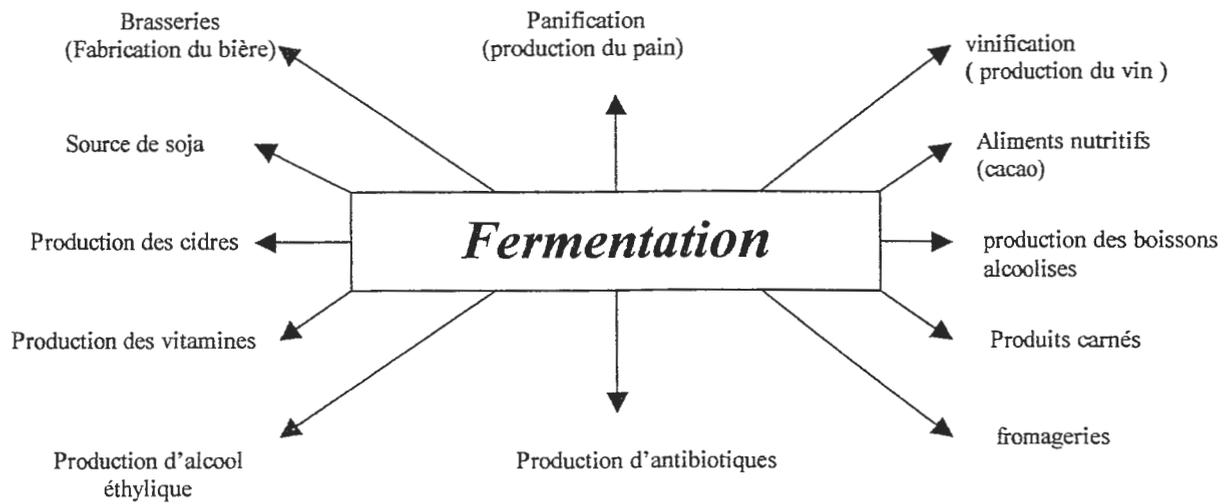


Figure 5 : schéma des différents domaines d'utilisation de la fermentation des levures [2;10;14;35;46].

CHAPITRE II

ASPECT BIOCHIMIQUE DES LEVURES

Chapitre II

Aspect biochimique

Comme tous les organismes hétérotrophes, les levures nécessitent une source d'énergie et de matériaux sous forme de molécules organiques. Ces molécules sont à l'origine de la plupart des métabolites cellulaires [29;41].

La croissance des levures s'effectue sur un milieu simple des hydrates de carbone utilisées comme source de carbone et d'énergie, l'azote par la synthèse protéique, des sels minéraux et un ou plusieurs facteurs de croissance [36].

Parmi les hydrates de carbone qui peuvent être fermentés par la levure, on trouve des mono, des di et des trisaccharides. Les plus efficaces des sources de carbones sont des oses, glucose, fructose et mannose qui sont utilisables par plus de 400 espèces identifiées.

En règle générale, les levures sont incapables d'utiliser directement des macromolécules glucidiques du milieu [29].

D'autres composés sont nécessaires, exemple : L'acide pantothénique, acide nicotinique, la thiamine, la pyridine. La plus d'entre eux sont des co-facteurs indispensables pour l'activité enzymatique [36].

II-1-metabolisme du glucose chez *Saccharomyces cerevisiae* :

Le glucose joue un rôle important, d'une part, il constitue une source de carbone par sa participation à la formation des précurseurs nécessaires à l'édification de la masse cellulaire, d'autre part il est une source d'énergie et source réductrice, par la fourniture de l'énergie nécessaire à cette édification.

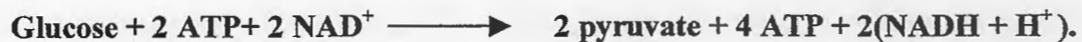
En effet, le métabolisme du glucose est divisé en deux voies principales, en premier lieu le catabolisme qui est une dégradation enzymatique du glucide en molécules plus petites, qui a pour conséquence une augmentation d'entropie, donc une libération d'énergie libre liée à la structure complexe de la molécule de glucose. Cette énergie est conservée sous forme de liaisons phosphate de l'adénosine triphosphate (ATP).

En deuxième lieu l'anabolisme qui est la synthèse enzymatique à partir de précurseurs simples des molécules qui entrent dans la composition cellulaire. Il s'agit donc d'un processus qui augmente la taille et la complexité des structures moléculaires et qui se fait avec diminution d'entropie [13].

L'énergie nécessaire lui est fournie par les liaisons phosphates de l'ATP. D'où l'importance relative des différentes voies métaboliques de dégradation du glucose. Ces voies sont principalement :

II-1-1-La voie de la glycolyse :

La voie d' Embden-meyrhop parnas (EMP) est souvent appelée voie glycolytique ou voie anaérobie. C'est la première étape de dégradation du glucose (*figure 6*), elle ne nécessite pas d'oxygène et de bilan global de la séquence de réactions est le suivant :



La glycolyse se fait avec un gain net de 2 ATP par molécule de glucose métabolisée, cependant ; sur un milieu synthétique (milieu avec un minimum d'extrait de levures pour fournir les facteurs de croissance). Le glucose joue le rôle de source d'énergie et de source de carbone cellulaire ; il y a un manque de précurseurs pour la biosynthèse de certains acides aminés, nécessaires à la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) . Sur ce milieu la levure ne peut croître en utilisant uniquement la voie EMP ; et nous avons le cycle de pentoses qui fournit les métabolites et joue de ce fait un rôle bio-synthétique [30].

II-1-2 La voie des pentoses phosphates :

La voie des pentoses phosphates ou shunt des hexoses phosphates peut être considérée comme une voie alternative de dégradation du glucose (*figure 7*).

Cette voie aboutit à la formation de deux importants produits : Le NADPH qui est utilisé comme pouvoir réducteur dans de nombreuses réactions et les pentoses phosphates, notamment le ribose 5- phosphate précurseur des nucléotides et des acides nucléiques. En effet, cette voie se divise en deux parties l'une est oxydative irréversible et convertit le glucose 6- phosphate en pentose phosphate avec production de NADPH, l'autre est non oxydative réversible et implique l'inter conversion des pentoses phosphates en hexoses phosphates et trioses phosphates [30].

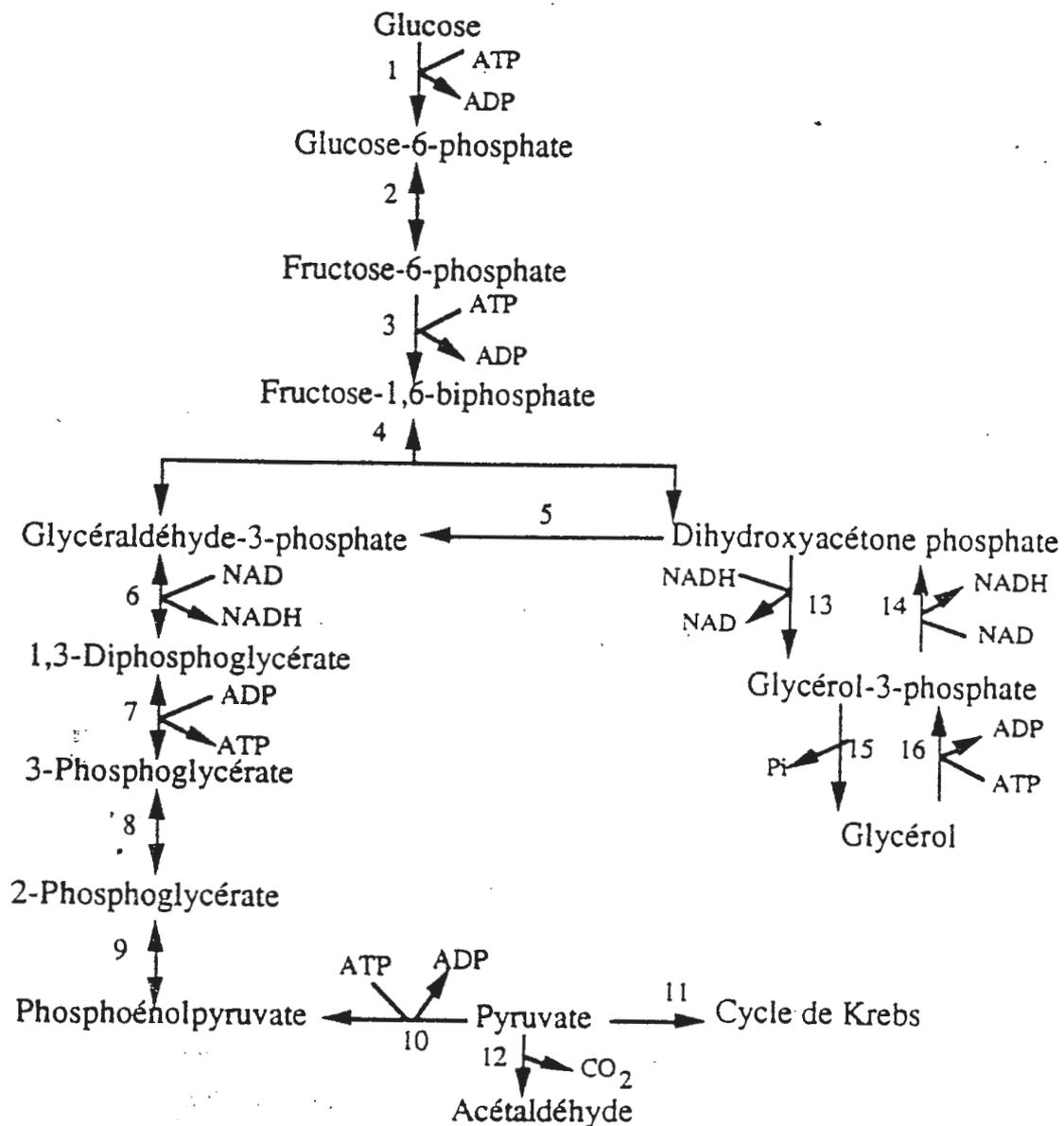


Figure 6 : voie de la glycolyse (Boton, 1990)[6].

Les enzymes indiquées par les chiffres sont les suivantes : 1 : hexokinase, 2 : phosphoglucose isomérase, 3 : phosphofructokinase, 4 : fructose 1.6-biphosphate aldolase, 5 : triose phosphate isomérase, 6 : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, 7 : phosphoglycérate kinase, 8 : phosphoglycérate mutase, 9 : émolase, 10 : pyruvate kinase, 11 : pyruvate déshydrogénase, 12 : pyruvate décarboxylase, 13 : dihydroxyacétone phosphate réductase, 14 : glycéról 3-phosphate déshydrogénase, 15 : glycéról 1-phosphatase, 16 : glycéról kinase

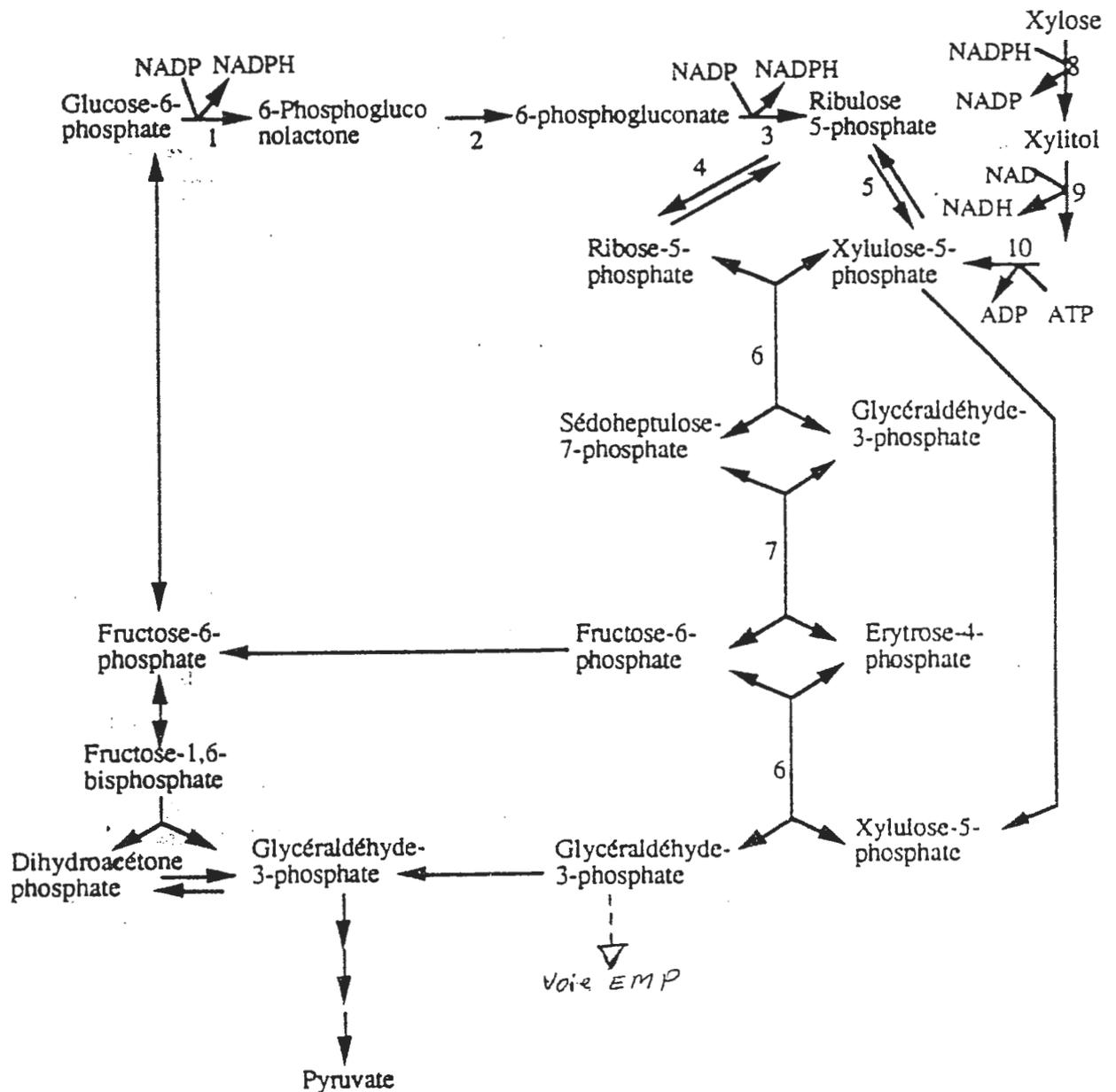


Figure 7 : cycle des pentoses phosphates et entrée du xylose dans le cycle oxydatif (Moat et Foster,1988) [30].

Les enzymes indiquées par des chiffres sont les suivants : 1 :glucose 6-phosphate déshydrogénase ; 2 : 6-phosphogluconolactonase ;3 :6-phosphogluconate déshydrogénase ; 4 :ribose 5-phosphate isomérase ; 5 : ribulose 5- phosphate 3-épimérase ; 6 : transcétolase ; 7 : transaldolase .

Phosphorylation du xylose ; les enzymes sont les suivantes : 8 :réductase à NADPH ; 9 :déshydrogénase à NAD ; 10 : Xylulokinase.

II-2-Régulation du métabolisme chez *Saccharomyces cerevisiae*:

Saccharomyces cerevisiae: est une levure aérobie facultative, sensible aux phénomènes de répression par le glucose. La voie métabolique par la quelle elle dégrade le substrat est par conséquent fonction de celui-ci, des conditions d'aération et de composition du milieu de croissance. Deux métabolismes limites caractérisent l'assimilation du glucose par la levure : un métabolisme respiratoire pour les faibles concentrations en substrat et un métabolisme fermentation pour les concentrations plus fortes [13].

Il est important de signaler que le quotient respiratoire est un facteur important qui nous permet de savoir quel type de métabolisme [10].

Soit Q_R : quotient respiratoire

$$Q_R = \text{CO}_2 \text{ produit} / \text{O}_2 \text{ consommée}$$

Si $Q_R > 1 \Rightarrow$ le métabolisme est fermentaire

Si $Q_R < 1 \Rightarrow$ le métabolisme est respiratoire.

II-2-1-Métabolisme respiratoire du glucose :

Dans des conditions aérobies et pour de faible concentration en glucose , le métabolisme est orienté vers les voies respiratoires : à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne terminale de transport d'électron , l'oxydation du glucose est complète et se fait suivant la réaction [13] :



2-1-1-Effet Pasteur :

l'oxygène contrôle la voie des micro-organismes par stimulation ou inhibition de leur fonctions métaboliques. L'effet pasteur se traduit par une diminution en présence d'oxygène ,de l'activité des enzymes de la glycolyse ainsi que de certaines enzymes du cycle de Krebs [13;37].

Par exemple ,un métabolisme oxydatif actif entraînant une accumulation rapide d'ATP au détriment de l'AMP .Le faible taux d'AMP provoque l'accumulation de citrate

(l'isocitrate déshydrogénase n'est plus synthétisée). L'ATP et le citrate accumulés inhibent la phosphofructokinase au niveau de la glycolyse. Cette inhibition ralentit le flux glycolytique, donc la formation d'ATP et du citrate qui l'on provoqué ; elle va par conséquent avoir tendance à diminuer.

D'autres produits secondaires s'accumulent cependant sous l'effet de l'oxygène et inhibent la croissance, comme par exemple l'acétaldéhyde et l'acide acétique [32].

II-2-2-Métabolisme fermentaire du glucose :

Dans des conditions d'aération normale, mais en présence de fortes concentrations en glucose, il y a répression de la respiration ; le métabolisme devient alors essentiellement fermentaire.

2-2-1- La répression catabolique ou effet crabtrée :

La déviation de la dégradation du glucose d'un métabolisme respiratoire à un métabolisme fermentaire par les concentrations croissantes de substrat, est appelée effet crabtrée. Elle est due à la répression par le glucose de la synthèse de certaines enzymes du cycle de Krebs et surtout du shunt du glyoxylate. L'activité respiratoire de la levure s'en trouve amoindrie et ses besoins en énergie (oxydation des co-enzymes réduits) sont complétés par réduction du pyruvate en éthanol [17].

II-2-3-Métabolisme respiratoire de l'éthanol :

L'éthanol accumulé durant la première phase de dégradation du glucose (phase fermentaire) peut être réassimilé une fois levée la répression par le substrat. La respiration de l'éthanol se fait par le cycle de Krebs suivi de la chaîne respiratoire selon la réaction :



Le shunt du glyoxylate assure la fourniture de métabolites nécessaires aux biosynthèses. Le catabolisme respiratoire de l'éthanol produit 6 à 11 ATP par mole d'éthanol [28].

II-2-4-Influence de métabolites secondaires :

2-4-1- Effet de l'éthanol :

la répression catabolique et le faible taux d'oxygène dans le milieu réactionnel favorisent la formation de l'éthanol. L'éthanol formé, en plus du fait qu'il constitue un gaspillage d'énergie pour les procédés de production de biomasse, intervient par ses effets inhibiteurs résultant de son accumulation ou de sa réassimilation par les microorganismes.

Ces effets inhibiteurs ont fait l'objet de nombreux travaux **Nagodawithana** et al (1976), comparent la nocivité, pour des souches de *Saccharomyces cerevisiae*, de l'éthanol produit par les cellules à celle de l'éthanol ajouté à un milieu de croissance : l'éthanol formé a un effet létal plus important que l'éthanol ajouté et il serait judicieux de favoriser son passage à travers la membrane cellulaire pour éviter son accumulation au niveau des sites réactionnels. Ces résultats ont été confirmés par **Novack** et al (1981), à partir d'une comparaison de la constante d'inhibition de l'alcool produit par des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* et de celle déterminée lorsque l'alcool est ajouté au milieu.

Novarro (1981), a étudié l'influence de l'éthanol sur les enzymes de la voie de la glycolyse et il a constaté que l'hexokinase est la plus sensible à l'éthanol. Ces résultats sont en accord avec le schéma de la Figure 9 proposé par **Nagodawithana** et al (1976) pour expliquer la régulation de la glycolyse par l'éthanol [13].

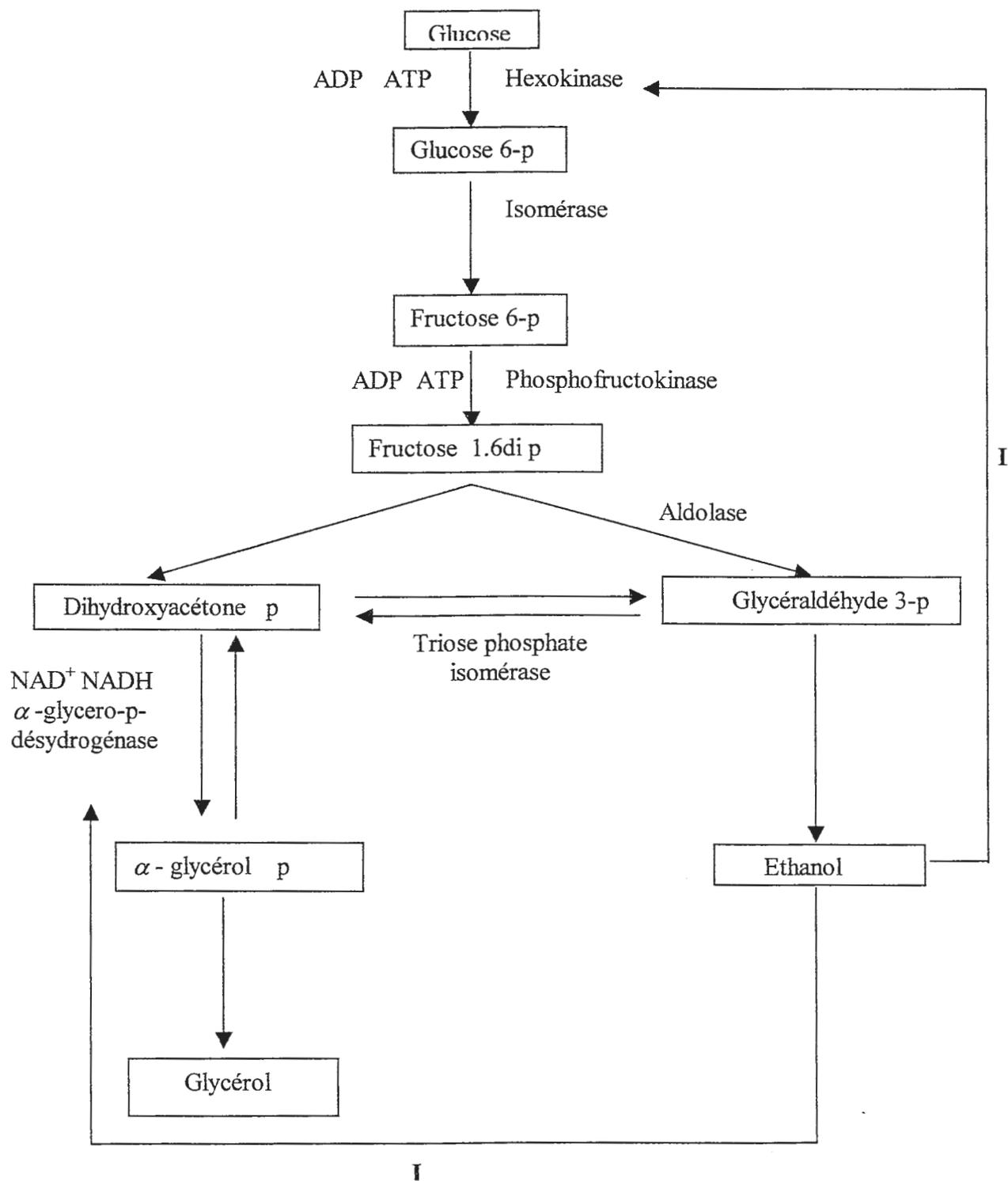


Figure 9 : Sites d'action de l'éthanol d'après Nagoda Withana et al(1976) [13].

I : Inhibition par l'éthanol

2-4-2-Autres métabolites secondaires :

La croissance des levures s'accompagne souvent de la production en très faible quantité de nombreux métabolites secondaires ; la plus part étant volatils, leurs effets inhibiteurs se manifestent à des seuils de concentration très bas. Deux de ces métabolites (l'acétaldéhyde et l'acétate) sont liés directement à l'assimilation de l'éthanol et considérés comme les vrais responsables des effets inhibiteurs observés au cours d'une croissance sur éthanol . L'assimilation de l'éthanol (Figure 10) passe par l'intermédiaire de ces deux métabolites et leur accumulation est souvent remarquée en culture menée en réacteur fermé(discontinu). L'ajout de ces substances à des cultures en pleine croissance se traduit par un ralentissement ou arrêt total de la croissance. Pour expliquer ces phénomènes , **Moulin** et al (1980) a proposé les mécanismes montrés dans la Figure (10) [13].

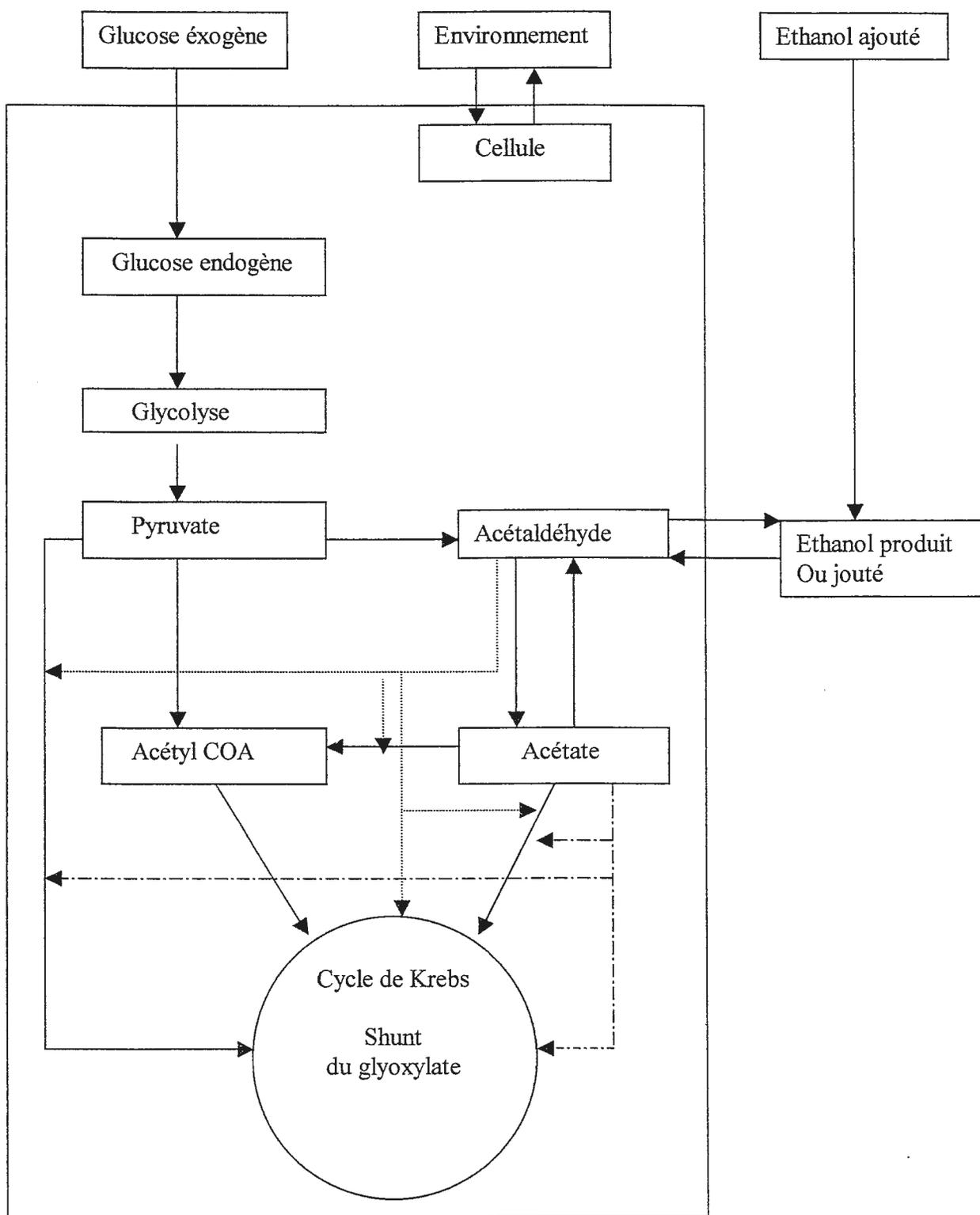


Figure 10 : Mécanisme d'inhibition de la croissance de levures par l'acétaldéhyde et l'acétate (Moulin et al 1980) [13].

- > Flux réactionnel
-> Mécanisme d'inhibition par l'acétaldéhyde .
- - - -> Mécanisme d'inhibition par l'acétate.

CHAPITRE III

DECHETS INDUSTRIELES
UTILISES POUR LA
PRODUCTION DE BIOMASSE

CHAPITRE III

Déchets industriels utilisés pour la production de Biomasse

III-1- La mélasse:

III-1-1- Définition:

La mélasse a un goût sucré et très visqueux, riche en impuretés, récupéré après cristallisation, elle est de couleur noirâtre, à l'apparence d'un produit épais, avec une teneur en saccharose environ 35% et 20% de glucose. On compte 30 kilos de mélasse pour une tonne de canne, on peut en faire plusieurs produits.

- De l'alcool après fermentation.
- Des aliments pour bétail.
- De la levure pour boulangerie [43;44].

La mélasse sèche est une poudre de couleur brun foncé et découlement facile qui se mélange bien aux autres ingrédients de la ration et qui n'est jamais collante, (hiver comme été).

La composition de mélasse sèche représente selon le tableau 4.

Tableau 4 : composition de mélasse sèche de canne à sucre :

Protéine brutes (min)	5.00%	Sucres totaux invertis (min)	38.00%
Gras brut (min)	0.30%	Humidité(max)	6.00%
Fibres brutes (max)	30.00%	Mélasse liquide(équivalent)	82.5%

Ce produit contient 35% d'écales de soja, le reste de la matière sèche étant la mélasse de canne à sucre.

La mélasse sèche est une mélasse de canne à sucre facilement manipulable, qui est spécialement conçue pour l'alimentation animale et qui est souvent une source d'énergie hautement digestible [49]

III-1-2- Mélasse de canne à sucre :

La canne à sucre est le « roseau sucré » légendaire, cultivée d'abord uniquement pour son jus. Puis l'homme, ayant fait des progrès dans le domaine scientifique, parvient par des procédés complexes à synthétiser les cristaux de sucre translucides à partir du jus.

La mélasse de canne utilisée pour la fabrication d'alcool, d'éthanol et de nourriture pour les animaux [48], et diffère de la mélasse de betterave sur plusieurs points :

- Le métabolisme de la plante d'origine étant très différent de celui de la betterave sucrière, les divers substances nutritives non-sucre présentes dans cette mélasse sont d'une tout autre nature ;
- Les glucides (environ 50%) sont repartis en saccharose (30% à 40%) et en glucides réducteurs (15 à 20%) constitués le glucose et le fructose ;
- De nombreux acides minéraux et organiques sont présents ce qui donne, à l'inverse de la mélasse de betterave, un PH inférieur à 7. le moût obtenu aura donc une acidité non négligeable ce qui devra être pris en compte dans les paramètres de la fermentation.
- De nombreuses poly-glucosides divers sont répertoriés : pentosane (arabane et xylane) ; dextrane (cellulose, galactane , galactoxylane).

Ces produits constituent environ 2 à 4% de la mélasse , ces molécules ne peuvent pas être utilisées par la levure en fermentation [11].

III-1-3- Mélasse de betterave :

Le sucre naturel de la betterave et la canne s'appelle 'Saccharose' (ou sucrose) et est constitué de l'union moléculaire du jus des plantes (fructose) avec une substance appelée 'glucose'. Le glucose a également un goût sucré, mais ce goût est moins prononcé que le saccharose (70%) [48].

Le tableau 5 permet la comparaison entre la composition chimique type de la mélasse de betterave et celle de la mélasse de canne [47].

Tableau 5 : composition chimique de la mélasse de betterave et de la mélasse de canne (analyse de la matière fraîche) [47].

	Mélasse de betterave	Mélasse de canne
PH	8,7	5,1
Sucre totale (%)	42 – 47	45 – 48
Azote totale (%)	1,6 – 2,0	0,2 – 0,8
Phosphore (%)	0,02	0,08
Calcium (%)	0,15	0,8
Potassium (%)	4,8	3,6
Sodium (%)	1,1	0,2
Chlore (%)	1,2	1,6
Cendre (%)	9,0	8,5
Matière sèche (%)	75 - 80	70 - 72

III-2- Milieu naturel à base de Ghars :

La datte est un fruit , à pulpe sucrée comestible, aliment apprécié dans le monde .La datte occupe une place de choix comme aliment et se compare très favorablement à la plupart des autres produits , sa valeur calorifique est comparable à celle du pain [29].

Si on revient à la composition de la datte , on remarque que le calcium est particulièrement abondant puisqu'il se trouve en quantité équivalente à celle du lait de vache, on constate également que les dattes sont riches en fer et manganèse[29].

De nombreuses analyses faites par différents auteurs et dans différent pays , ont démontrée que la teneur en sucre est assez élevée (80%). Tandis que les matières protéiques et les lipides représentent respectivement à peine 1,4 et 1,3%[29].

La datte constitue par conséquent un aliment glucidique contenant trois sucres : le saccharose , le glucose , et le fructose ; ceci n'exclue pas la présence d'autres sucres qu'il faudra rechercher[29].

La composition des dattes et du Ghars est présentée dans les tableaux (6 et 7) les suivants :

Tableau 6 : composition de la datte Sèche [40].

Teneur pour 100 g de datte	
Energie	300.00 Kcal
Energie	1276.00 K j
Eau	19.00 g
Protéines :	2.00 g
- Végétales	2.00 g
Glucides disponibles	73.00 g
-Sucre	73.00 g
Fibres alimentaires	8.70 g
Lipides	0.05 g
Sodium	5.00 mg
Potassium	75 mg
Magnésium	59 mg
Phosphore	64 mg
Calcium	68.00 mg
Fer	1.60 mg
Carotène	50.00 µg
Thiamine	0.07 µg
Riboflavine	0.04 µg
Vitamine B ₆	0.13 mg
Vitamine C	3.00 mg
Niacine	2.00 mg
Acide pantahothélinique	0.80 mg
Folacine	21.00 µg

Tableau (7) : composition du Ghars : [40].

Constituants	%
Résidu sec	86.45
Protéines	2.25
Graisses	0.16
Cendres	1.59
Glucose	34.88
Fructose	35.76
Pectines totales	1.47
Potassium	0.44
Acidité totale d'acide citrique	0.42
Monohydraté	

III-3- Le lactosérum :

Le lactosérum constitue un excellent milieu de culture notamment pour tous les organismes susceptibles de métaboliser le lactose.

Cette propriété a été mise à contribution dans de nombreux domaines et en premier lieu dans la production de levure [9].

III-3-1-Généralité :

3-1-1- Définition :

- **Définition technologique :**

Le lactosérum est un sous produit de la fromagerie et de caseinerie.

C'est un liquide présentant un aspect légèrement opalescent, de couleur jaune verdâtre due à la riboflavine, est le produit de la coagulation du lait, soit par la présure lors des fabrications fromagères, soit par un acide dans le cas de production de caséine [12].

- **Définition nutritionnelle :**

La composition du lactosérum varie selon son origine [9]. Il retient environ 55% des éléments nutritifs. En dehors de sa haute teneur en lactose, en sels minéraux et en vitamines hydrosolubles (surtout du groupe B), le lactosérum présente une teneur non négligeable en protéines de valeur nutritionnelle élevée [33].

3-1-2- Sources industrielles du lactosérum :

Les deux principales voies industrielles de transformation du lait nature aboutissant au lactosérum, sont la beurrerie et la fromagerie (planche I) [33].

a - La Beurrerie :

D'après J.keilling et R.dewilde cité par Dakhmouche, la beurrerie est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication du beurre à partir du lait nature. Après écrémage de ce dernier suivi d'une extraction de la caséine par précipitation on obtient du « lactosérum écrème » [9].

b - La fromagerie :

C'est l'ensemble des procédés qui conduisent à la fabrication des fromages à partir du lait nature qui subit un processus de coagulation et de synérèse aboutissant d'une part à une phase solide « le fromage », d'autre part à une phase liquide « le lactosérum brut » [9].

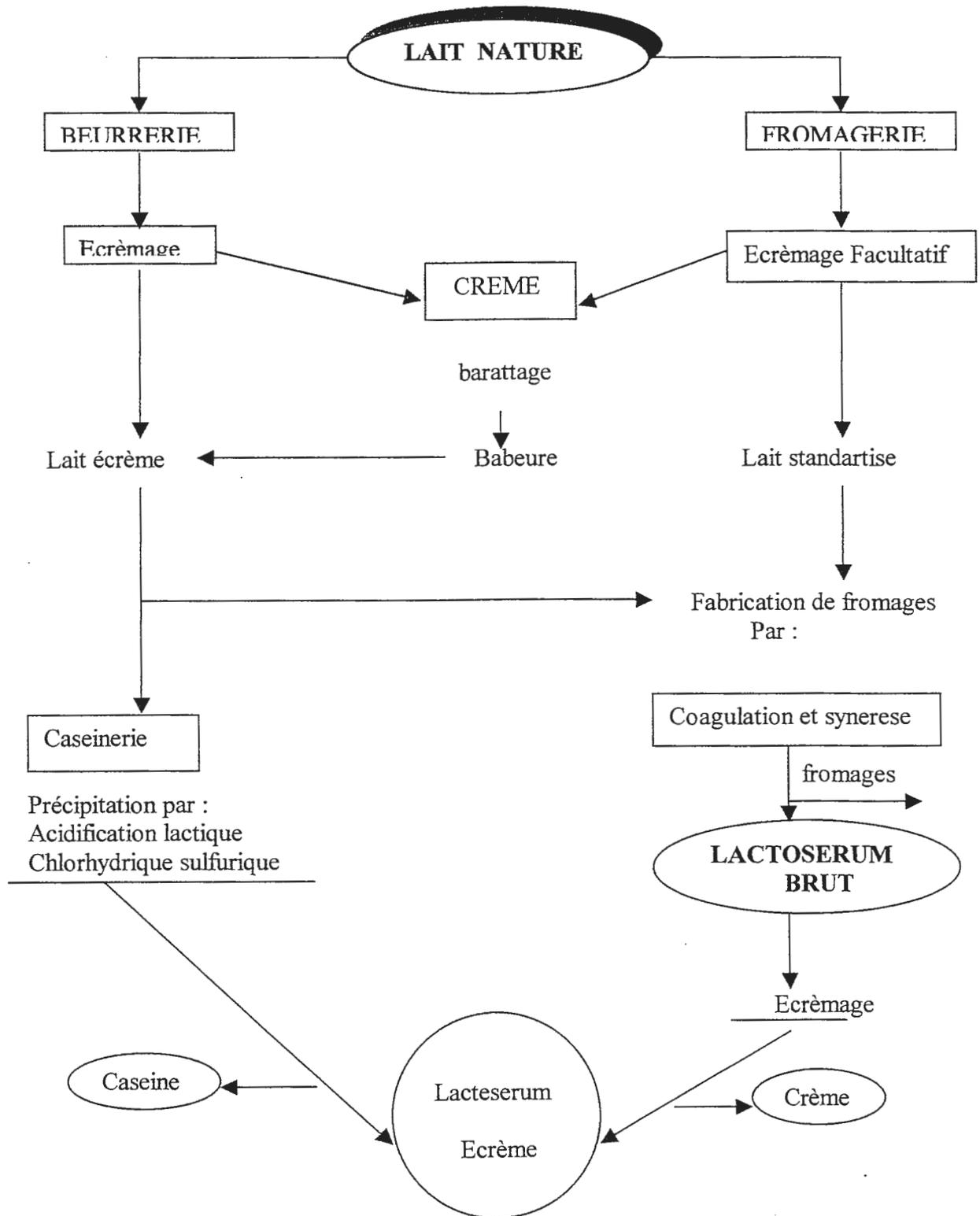


Planche I : principales voies industrielles de transformation du lait nature [9].

3-1-3-Caractéristiques de lactosérum :

Selon le type de fromage fabriqué, on distingue :

a- Le lactosérum doux :

PH environ de 6,5 à 6,7 , c'est le lactosérum obtenu par caillage à la présure caractéristique des pâtes pressées cuites ou non-cuites [42].

b- Le lactosérum acide :

PH environ de 4,5. Il provient de la fabrication des fromages frais a caillage lactique [42].

3-1-4-Propriétés de lactosérum :

Le lactosérum est caractérisé par sa sensibilité aux fermentations diverses ; sa richesse en sucre, son PH, et sa température en font un milieu particulièrement favorable au développement des bactéries lactiques.

Il renferme environ 94% d'eau, cette teneur pose de sérieux problèmes de transport et de stockage, ce qui rend nécessaire certains traitements préalables qui consistent en l'installation d'unités centrales ou régionales de traitement (ex : séchage), destinés notamment à mieux adapter la composition du produit aux diverses utilisations industrielles [12].

III-3-2- Etude quantitative et qualitative de lactosérum :

La composition du lactosérum est variable et dépend de plusieurs facteurs , parmi lesquels :

- Le type de sérum qui varie selon la composition initiale du lait qui liée essentiellement à la race de l'animal, la période de lactation et de l'alimentation, d'après **Collet** et **Février** cité par **Djellal** [12].
- Les différents traitements technologiques que l'on fait subir au lait pour le transformer en fromage ou en caséines [12].

La composition de lactosérum est variable en fonction du type de lactosérum (*tableau 8*).

Tableau 8 : les types de lactosérum [42] .

	Doux : emmental	Doux : cammenbert	Acide : fromage frais
- PH	6,7	6,1	4,6
-extrait sec en g/l	65 g/l	65 g/l	60 g/l
-Lactose	50 g/l	49 g/l	39 g/l
-protéines	8,5 g/l	8,5 g/l	7,2 g/l
-Minéraux	5 g/l	6 g/l	7,2 g/l
-Matières grasses	0,5 g/l	0,5 g/l	0,3 g/l
-Acide lactique	1 g/l	1,5 g/l	6 g/l

3-2-1- Le lactose :

La teneur du lactosérum en lactose est sensiblement égale à celle du lait écrémé (45 à 50 g/l), il présente en viron 70% de la matière sèche du sérum [33]. Le lactose est un diholoside, synthétisé par la glande mammaire à partir du glucose sanguin [9].

Physiologiquement, le lactose est hydrolysable par le lactase ou β -galactosidase intestinale des mammifères, et donne une molécule de glucose et une de galactose.

Chimiquement, il peut subir un certain nombre de réactions autre que l'hydrolyse [33]. D'autre part, sous l'action des fermentes lactiques, le lactose est transformé en acide lactique, cette propriété est très importante sur le plan technologique, car l'acidité plus ou moins grande des sérums conditionne en partie leur possibilité d'utilisation.

Saccharomyces cerevisiae ne peut pas hydrolyser la liaison galactose-glucose de ce disaccharide, par contre il est possible d'utiliser sur ce substrat ^{par} *Candida tropicalis* et *Kluyveromyces fragilis* [11].

3-2-2- Les protéines :

Les protéines du lactosérum ou lactoprotéines, représentent 16% des matières azotées du lait.

Il s'agit de protéines de valeur nutritive très élevée, et d'une qualité exceptionnelle [33].

La valeur nutritionnelle d'une protéine se juge en priori par la comparaison de sa composition en acides aminés dits indispensables à celle d'une protéine de référence.

Les protéines du lactosérum sont les protéines du lait qui ont la plus grande efficacité alimentaire; en effet, 100g de protéines totales du lait renferment 7,75 % de lysine alors que 100 g de lactoprotéines renferment 10,50%.

Ainsi d'après les travaux du C.N.R.S. la teneur en acides aminés essentiels, les pourcentages des protéines de lactosérum comparées aux protéines totales du lait est résumé dans le tableau 9 [12].

Tableau :9 : acides aminés en gramme pour 100gramme de protéine (d'après les travaux du C.N.R.S à Bellevue cité par Djellal.M) [12]

Acides aminés essentiels	Protéines du lait	Protéines du lactosérum
Tryptophane	1,216	1,378
Lysine	8,810	10,98
Méthionine	3,070	1,945
Cystéine	0,566	1,351
Thréonine	4,700	5,030
Leucine	9,833	7,090
Isoleucine	4,800	4,054
Phénylalanine	5,183	3,476
Valine	5,550	5,545

3-2-3- Les sels minéraux :

Toutes les matières minérales en solution dans le lait se retrouvent dans le lactosérum et selon certaines pratiques fromagères, avec des sels ajoutés.

Les 8 à 10% de matières, de l'extrait sec du sérum sont constituées de 50% de chlorure de sodium (NaCl) et de potassium et pour le reste, de différents sels de calcium principalement sous forme de phosphate.

Le tableau 10 suivant représente les principaux sels minéraux du lactosérum et leurs teneurs respectives [12].

Tableau 10 : principaux sels minéraux du lactosérum [12].

Principaux sels minéraux	Teneurs en g/l.
Phosphore	0,4-0,6
Calcium	0,5-1,3
Potassium	1,5-2,0
Sodium	0,5-0,7
Chlorure	2,1-2,7.

Toute fois, cette quantité importante de sels minéraux dans le lactosérum présente souvent un handicap pour son utilisation, en raison de son goût salin ou d'un apport exagéré en sodium et en potassium dans le cas des aliments infantiles et diététiques [33].

3-2-4- Les vitamines :

Ce sont des substances organiques sans valeurs énergétiques qui à l'état de trace permettent la croissance, l'entretien, le fonctionnement de l'organisme, celui-ci est incapable de les synthétiser.

Le lactosérum constitue une source importante de vitamines hydrosolubles plus particulièrement celle du groupe B.

Le tableau 11 présente les teneurs moyennes (en mg pour 100 g de produit: D'après revue laitière Française n°372 cité par Djellal.M [12].

Tableau 11 : les teneurs moyennes des vitamines du lactosérum [12].

Vitamines	Teneurs en mg
Thiamine : vit B ₁	4
Riboflavine : vit B ₂	43
Acide nicotinique : vit B ₃	12,5
Pyridoxine : vit B ₆	5,3
Cyanocobalamine : vit B ₁₂	0,159
Acide pantothénique	45
Acide folique	0,03
Biotine	116

Parmi les rôles nutritionnels que peuvent jouer ces vitamines on peut citer quelques exemples :

- La thiamine (vit B₁) est nécessaire à l'alimentation de la plupart des vertébrés et de quelques microorganismes.
- La riboflavine (vit B₂) joue le rôle d'un coenzyme.
- Enfin la cyanocobalamine (vit B₁₂) intervient dans différents métabolismes[12].

III-3-3-Produit de fermentation à partir du lactosérum :

L'utilisation du lactosérum comme substrat de fermentation a intéressé les bactériologistes et les chercheurs en sciences laitières, concernés par la valorisation de cette matière première.

La faible concentration du lactosérum en nutriments et son arôme particulier interdisent son emploi pour certaines fermentations.

Néanmoins ; le lactosérum est un substrat adéquat pour la préparation des levures, d'alcools, d'acide lactique, des vitamines, d'enzymes, et autres produits de fermentation [33].

3-3-1-Le lactosérum : substrat de fermentation.

A fin d'apprécier l'aptitude du lactosérum comme milieu de culture en substrat de fermentation, il est nécessaire de rappeler sa composition :

Eau	93,1%
Matière grasse	0,3%
Protéines	0,9%
Lactose	4,9%
Minéraux	0,6%
Acide lactique	0,2%

Il contient en plus des vitamines B₁, B₂, C.

Le lactosérum acide contient plus d'acide lactique et moins de lactose que le lactosérum doux.

Le lactose est la principale source de carbone du lactosérum et seuls des micro-organismes capables d'utiliser ce sucre peuvent être cultivés sur ce substrat. Le lactosérum est d'efficace en composés azotés inorganiques, qui doivent lui être ajoutés [33].

3-3-2 Production de levures sur lactosérum :

De toutes les fermentations sur substrat de lactosérum, la plus intéressante, et la plus étudiée ces dernières années, est la fermentation des levures qui seront en suite utilisées en alimentation humaine et animale.

Les levures et produits levurés obtenus sont des sources très importantes de protéines et de vitamines. En France, il existe des procédés de production de levures en continu, procédé **Bel (1973)**, ou en discontinu, procédé **Devos (Gac et Coll ;1975)**, qui sont l'objet de protection par des brevets [33].

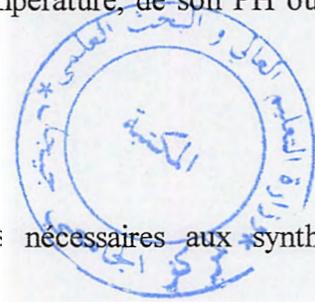
III-4- croissance des levures :

La cinétique de croissance des levures sur un substrat carboné est une résultante des aptitudes physiologiques de la souche à s'adapter aux conditions d'environnement. En effet la connaissance de cette aptitude est indispensable, d'une part pour le développement des procédés mettant en jeu des réactions biologiques, d'autre part pour définir les procédures

d'une conduite optimale selon l'objectif visé (production de biomasse, des métabolites ou les deux à la fois).

III-4-1 facteurs de croissance des levures :

La croissance d'un microorganisme peut être considérée comme une série d'interactions entre les cellules et l'environnement, le milieu apportant les éléments nécessaires à la croissance et étant lui-même modifié par le métabolisme des cellules. En plus de l'apport d'éléments nutritifs, le milieu crée au tour des cellules un environnement plus ou moins favorable en fonction de son humidité, de sa température, de son PH ou par présence de substances anti-microbiennes [27].



4-1-1 Besoins nutritionnels :

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

Le milieu doit donc apporter l'ensemble de ces éléments :

a -carbone

Les levures, comme tous les champignons sont des hétérotrophes et exigent du carbone organique, qui est le composé majeur de la cellule environ 50% du poids sec .

Les composés carbonés sont utilisés par les levures à la fois comme source d'énergie et de carbone (tableau 12).

D'après **Maleszka** et **Schneider,1982**.*Saccharomyces cerevisiae* est incapable d'utiliser les pentoses mais certaines espèces de *Candida*, *Metschnikowia*, *Pachysolen* et *Pichia* peuvent convertir le D-xylose en éthanol [27].

Tableau 12 : composés carbonés utilisables par *Saccharomyces cerevisiae* (D'après Kreger van Rij ,1984) [27].

D - glucose	Melibiose	Ethanol
D- galactose	Melezitose	D-glucitol
Mannose	Trehalose	Acide lactique
Fructose	Maltotriose	Raffinose
Saccharose	Déoxyribose	
Maltose	D-mannitol	

b - azote :

L'azote est quantitativement le deuxième constituant apporté par le milieu de culture. Il est utilisé par les cellules dans les acides aminés, les nucléotides et certaines vitamines.

Toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium. D'après **Kreger van Rij(1984)**, certaines levures sont capables d'utiliser les nitrites et les nitrates, en particulier les *Hansenula*, *Pachysolen*, *Citermyces* et certaines espèces de *Candida* et *Trichosporon*. Cette capacité est utilisée en taxonomie [27].

c- phosphore :

Le phosphore se trouve inclus dans les acides nucléiques et les nucléosides di et triphosphate. On le trouve aussi sous forme de polymères linéaires de polyphosphates qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme cellulaire (**Kulaev et Vagabov(1983)**) [27].

d- le soufre :

60% du soufre est incorporé dans les protéines. D'après **Maw,1960**, la source de soufre la plus fréquemment utilisée dans les milieux de culture est le sulfate d'ammonium. Les *Saccharomyces* sont également capables d'utiliser le sulfite et le thiosulfate [27].

e- potassium :

Le potassium est l'élément minéral quantitativement le plus important dans la levure. Il a des rôles physiologiques importants : exemple, il agit comme effecteur de nombreuses enzymes : pyruvate (**Maiorella et al(1984)**).

Les levures en fermentation consomment 2 fois plus de potassium qu'en respiration selon (**Jones et Greenfields (1984)**) [27].

f -Magnésium

Le magnésium est nécessaire au bon fonctionnement d'une certaine d'enzymes du métabolisme.

Une carence en magnésium en fermentation alcoolique entraîne une production d'acide acétique.

g-calcium :

Le calcium n'est pas indispensable à la croissance mais il joue un rôle de stimulateur chez les *Saccharomyces*. Il est utilisé pendant la phase de croissance. (Berry et Brown (1987)).

Le zinc joue un rôle essentiel dans le métabolisme, les ions ex : Fer ... d'autres composés peuvent être ajoutés au milieu de culture comme les vitamines. Vitamine B, (a un rôle sur le métabolisme respiratoire, le métabolisme des lipides, la glycolyse et la fermentation alcoolique selon Kamihara et Nnakamura (1982)). Le besoin pour des *Saccharomyces* est d'environ 5 mg.L⁻¹ en vitamine B₁ (thiamine ■■■) [27].

4-1-2- Influence de l'environnement :**a- La température :**

La température courante de culture des levures se situe entre 25°C et 30°C qui permet effectivement la croissance de la plupart des levures.

On distingue les levures psychrophiles, mésophiles et thermophiles.

La température minimale de croissance chez *Saccharomyces cerevisiae* est 20°C et la maximale étant vers 48 – 50°C. D'une façon générale, les levures ne sont pas thermorésistantes. La destruction commence dès 52°C. (Parry et al (1976)) [27].

b – L'oxygène :

Toutes les levures sont capables de se développer en présence d'oxygène ; il n'y a pas de levure anaérobies strictes.

Certaines levures sont aérobies strictes et d'autres aéro-anaérobies facultatives

Parmi elle :

-des levures préfèrent un métabolisme fermentaire même en présence d'oxygène.
Exemple : *Saccharomyces*.

-des levures qui préfèrent un métabolisme respiratoire s'il y a de l'oxygène : ce sont les *Candida*, la plupart des *Pichia* [27].

c- Les agents chimiques :

Parmi ces agents on distingue :

- Les acides organiques ont un effet inhibiteur sous leur forme non dissociée : en effet , L'ion H^+ ne pénètre pas dans la cellule mais l'acide non dissociée $R-COOH$ peut le faire.

- L'éthanol : toutes les levures ne présentent pas la même sensibilité a l'éthanol. Les plus résistantes sont les *Saccharomyces*.

D'après **Nagodathawa** et al (1977) ont montré que l'éthanol est excrété moins vite qu'il n'est produit : 13,8% d'éthanol ajouté dans le milieu ont le même effet inhibiteur que 9,4% d'éthanol produit par fermentation.

- Le sulfite a un effet inhibiteur plus prononcé sur les bactéries que sur les levures.

- Les antibiotiques : la sensibilité des levures a la cyclo-heximide est variable.

III- 4-2- Cinétique de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* :

Dans un système biologique , la croissance peut être définie comme étant une augmentation ordonnée de tous les composés chimique , cette augmentation en masse ne reflète pas réellement la croissance , et peut être due à un accroissement de la quantité de molécules de réserve dans la cellule [25].

La croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à fait l'objet de nombreuses études dans différentes conditions de milieu et mode de culture.

4-2-1- Croissance en discontinue (batch) :

Le système discontinue est définit comme étant un système dans le quel la croissance des micro-organismes se poursuit jusqu'à modification des conditions et épuisement du substrat , il s'agit donc d'une culture sur milieu non renouvelé, mais aéré, *Saccharomyces cerevisiae* qui est une levure sensible au glucose montre une croissance de type diauxie (Figure 11).

Quand la concentration en glucose est importante au départ, la croissance de la levure est élevée. Le glucose réprime la respiration et l'éthanol s'accumule , on assiste a un rendement en biomasse faible et un quotient respiratoire élevé qui sont les indicateurs d'un métabolisme fermentaire prédominant.

Une fois le glucose est épuisé, et après quelques heures d'adaptation de la levure a son nouvel environnement , une seconde phase de croissance rapide intervient qui correspond à l'utilisation de l'éthanol.

Durant cette deuxième phase on a un taux de croissance faible et un rendement en biomasse élevée et un quotient respiratoire faible qui sont caractéristique d'un métabolisme de l'éthanol.

Donc on a la phase initiale de croissance est de type fermentaire suivie par une phase de type oxydatif qui utilise l'éthanol produit.

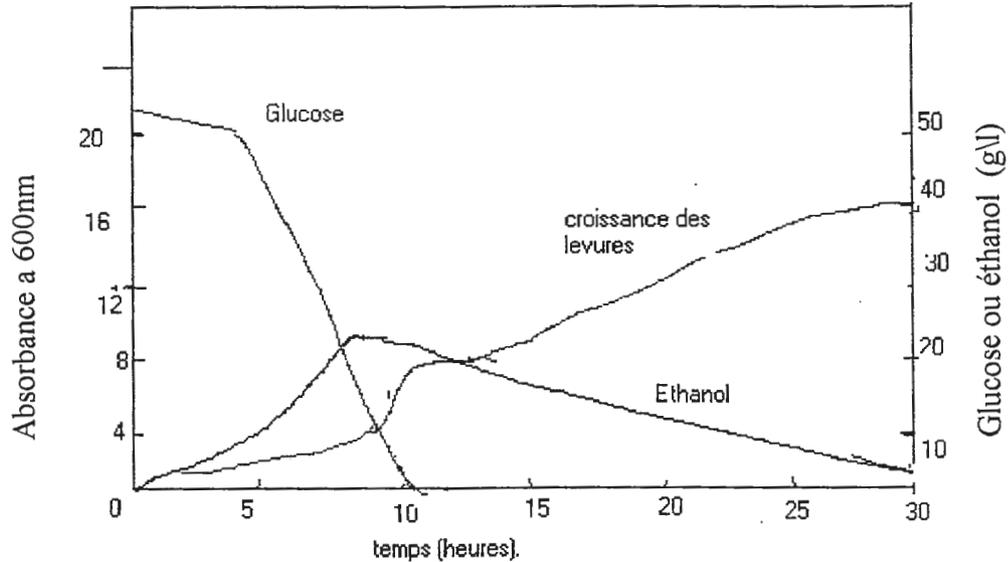


Figure 11 : Croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu discontinu (Lievens et Lim, 1982) [28].

4-2-2- Croissance en continu :

En culture continu sur milieu renouvelé et aéré, la vitesse de croissance de la levure est contrôlée par la concentration des substrats apportés (figure 12), lorsque le glucose est apporté à des concentrations faibles, le métabolisme est de type respiratoire, le rendement en biomasse est élevé, le quotient respiratoire est voisin de l'unité et l'éthanol n'existe qu'à l'état de traces. Au de la de certain seuil critiques de concentration en glucose la fermentation devient prédominante. Cette répression de la respiration par le glucose en conditions d'aérobiose qui mène à la production d'éthanol est classiquement appelée l'effet crabtrée.

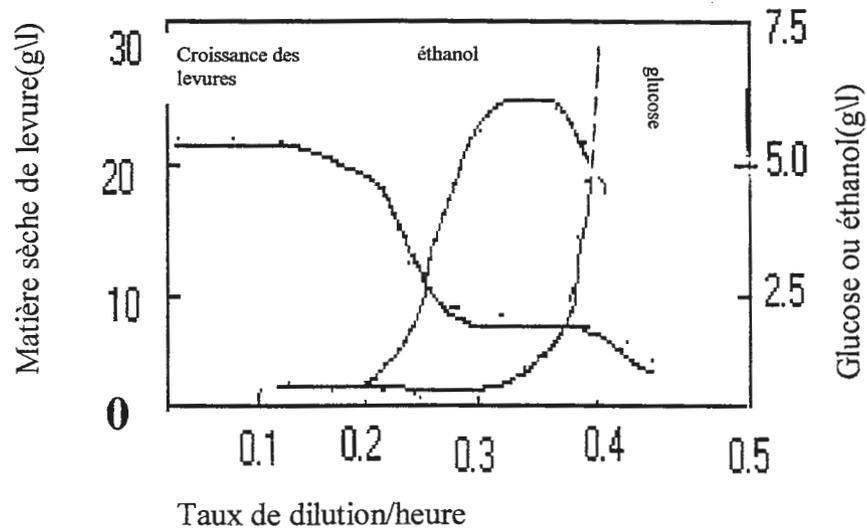


Figure 12 : croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue aérée , avec le glucose comme source limitante de carbone (Lievense et Lim,1982) [28].

Le modèle physiologique élaboré pour *Saccharomyces cerevisiae* (Rajab , 1983 , Rajab et al , 1984) distinguent les trois états limites suivant (Figure13).

Etat 1 : La Fermentation du glucose .Dans cette état la cellule se développe sur le glucose avec une production simultanée d'éthanol et d'acétate.

Etat 2 : La respiration du glucose. Le glucose est uniquement utilisé pour la production de nouvelles cellules.

Etat 3 : La respiration de l'éthanol. La levure reconsomme l'éthanol et l'acétate pour la synthèse de nouvelles cellules [35].

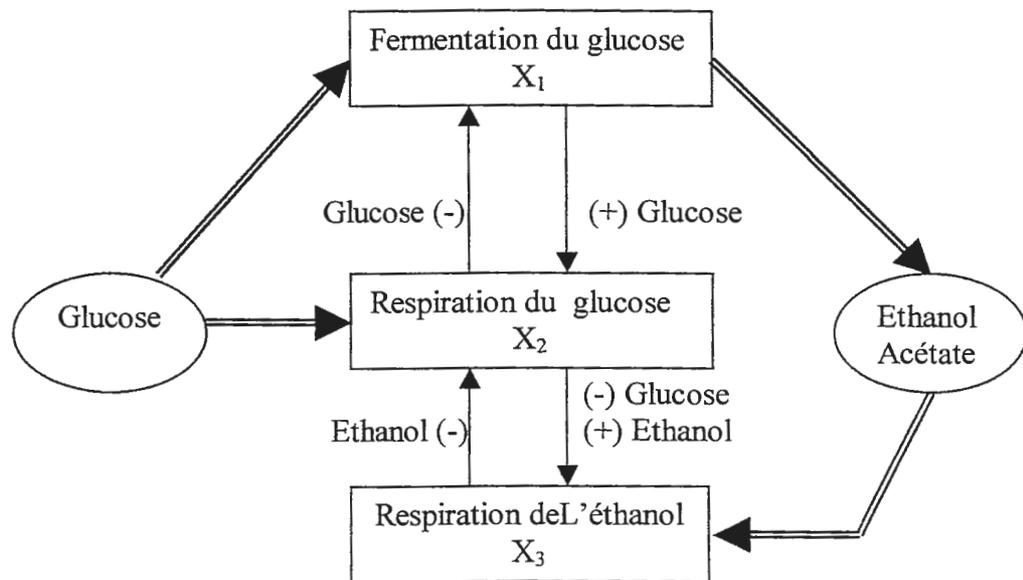


Figure13 : Modèle physiologique de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* [35].

4-2-3- Cinétique de croissance en discontinue :

La croissance microbienne peut être étudiée en fonction du temps, la méthode la plus pratique consiste à mesurer la densité optique d'une culture au cours du temps ; pour cela, la mesure de la croissance se fait essentiellement après une période d'adaptation au milieu, et on admet donc que le doublement d'une population microbienne s'accompagne d'un doublement de tous les composés constituant la cellule.

En effet, le cycle de croissance en milieu non renouvelé (discontinu) de la levure passe par différentes étapes :

- Entrée des nutriments qui doivent satisfaire les besoins de la souche.
- Phase de latence : où la levure s'adapte au substrat et développe son système enzymatique, la durée de cette phase est variable.
- Phase d'accélération : durant laquelle les cellules commencent à se développer.
- Phase exponentielle : correspondant au taux maximum de toutes les cellules viables.
- Phase stationnaire : au cours de celle-ci, le nombre de cellules ne varie plus, le taux de croissance est nul.
- Phase de déclin : correspond au vieillissement des cellules et de leur autolyse. Cette phase est provoquée par la diminution d'un facteur limitant pour la croissance (concentration du substrat ou de l'oxygène), ou l'accumulation des produits inhibiteurs de la croissance.

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

IV-1-Matériels :

- Lait de vache.
- Flacons de 250 ml .
- Erlenmeyers (200 ml).
- Pipette (20ml).
- Pipette Pasteur.
- Eprouvette (100ml).
- Entonnoire.
- Papier de filtration Watman.
- Four de Stérilisation.
- Autoclave.
- Lame de comptage (cellule) Type THOMA.
- Lame et lamelle.
- Microscope optique.
- Eau distillé.
- Eau de robinet.
- Bain-marie.
- Agitateur réglé.
- Barreaux magnétiques.
- Spectrophotomètre .
- Réfrigérateur.
- PH mètre.
- Thermomètre .
- Balance de précision .

• **Micro-organisme utilisé :**

La souche utilisée pour réalisé ce travail est une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* (levure de Boulangerie).

• **Préparation de lactosérum :**

Après la coagulation du lait pendant 48 heures on obtient un liquide, puis on lui fait : une filtration , et un autoclavage 20 min sous 1 bar 120°C pour la stérilisation.

IV-2 -Méthode de travail :

IV-2-1 – Estimation de la biomasse :

Elle s'effectue grâce à un spectrophotomètre , par lecture de la densité optique (D.O) à 660 nm.

a- Etalonnage de l'appareil :

Un étalonnage préalable du spectrophotomètre permet d'établir une corrélation entre la densité optique et la densité microbienne exprimé en g/l. Les échantillons sont dilués de façon a obtenir des densités optiques dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé , afin d'obtenir cette corrélation nous avons le protocole ci-après :

- 1/ Faire une suspension de levure (1g dans 100ml du milieu utilisé pour la croissance le « lactosérum »).
- 2/ Faire une série de dilutions (1/2 , 1 /4 , 1/8 , 1/10 , 1/20) dans des Erlenmeyers.
- 3/ Mesurer l'absorbance de chacune des dilutions avec un spectrophotomètre à 660 nm (il faut agiter la suspension avant chaque mesure).

Après chaque lecture de la densité optique on passe au dénombrement de cellules en utilisant une lame de numération.

b- Dénombrement des cellules :

Les cellules peuvent être comptées sous microscope en utilisant une lame de numération , hématimétrique , notre lame est de type THOMA.

Une goutte de suspension est placée sur la lame et recouverte d'une lamelle , on passe a l'examen au microscope au grossissement $\times 40$, le volume au dessus de chaque carré est de $1/4.10^6$ ml.

Soit ni le nombre de cellules compté dans P carrés (P=100).

On calculant la moyenne ;

$$n = \frac{n_1+n_2+\dots+n_p}{p}$$

Le nombre N de germes/ml de la suspension est ensuite déterminé par $N = n.4.10^6$ cellules / ml.

Les résultats obtenus sont illustrés par la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre qui représente $D.O = f$ [cellules].

IV-3 – suivi de croissance :

Le suivi de croissance a été effectué dans des Erlenmeyers de 250 ml, contenant respectivement 200 ml de lactosérum et 100 ml d'eau distillé , les Erlenmeyers sont mets dans un bain-marie à une température de 32°C sur agitateur magnétique avant l'ensemencement , les milieux sont autoclavés à 120°C pendant 15mn.

IV-3-1 – Mesure de la croissance :

Le suivi de l'évolution de la croissance en biomasse est fait par spectrophotomètre a une densité optique de 660 nm , toutes une heure.

IV-3-2 – Détermination du PH :

Il est indispensable de contrôler la PH du milieu , car les levures sont des microorganisme acidophiles ; donc le PH est mesuré à chaque prélèvement à l'aide d'une électrode de PH mètre plongée à l'intérieur de l'erlenmeyer contenant la suspension de fermentation.

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

Le contrôle de la croissance est réalisé par les mesures de la densité optique et de rendement de Biomasse .

Les valeurs de la concentration en Biomasse seront déduites d'une courbe d'étalonnage .

- **courbe d'étalon :**

La courbe d'étalonnage représente la densité optique en fonction de la concentration en Biomasse $D.O = f([cellules])$.

Dilutions	1/20	1/10	1/8	1/4	1/2
Concentrations des cellules (g/l)	6,72	10,24	27,5	35,6	41,8
D.O à 660 nm	0,71	1,21	0,37	1,69	2

D'après le tableau , on peut tracer la courbe d'étalonnage (figure 15).

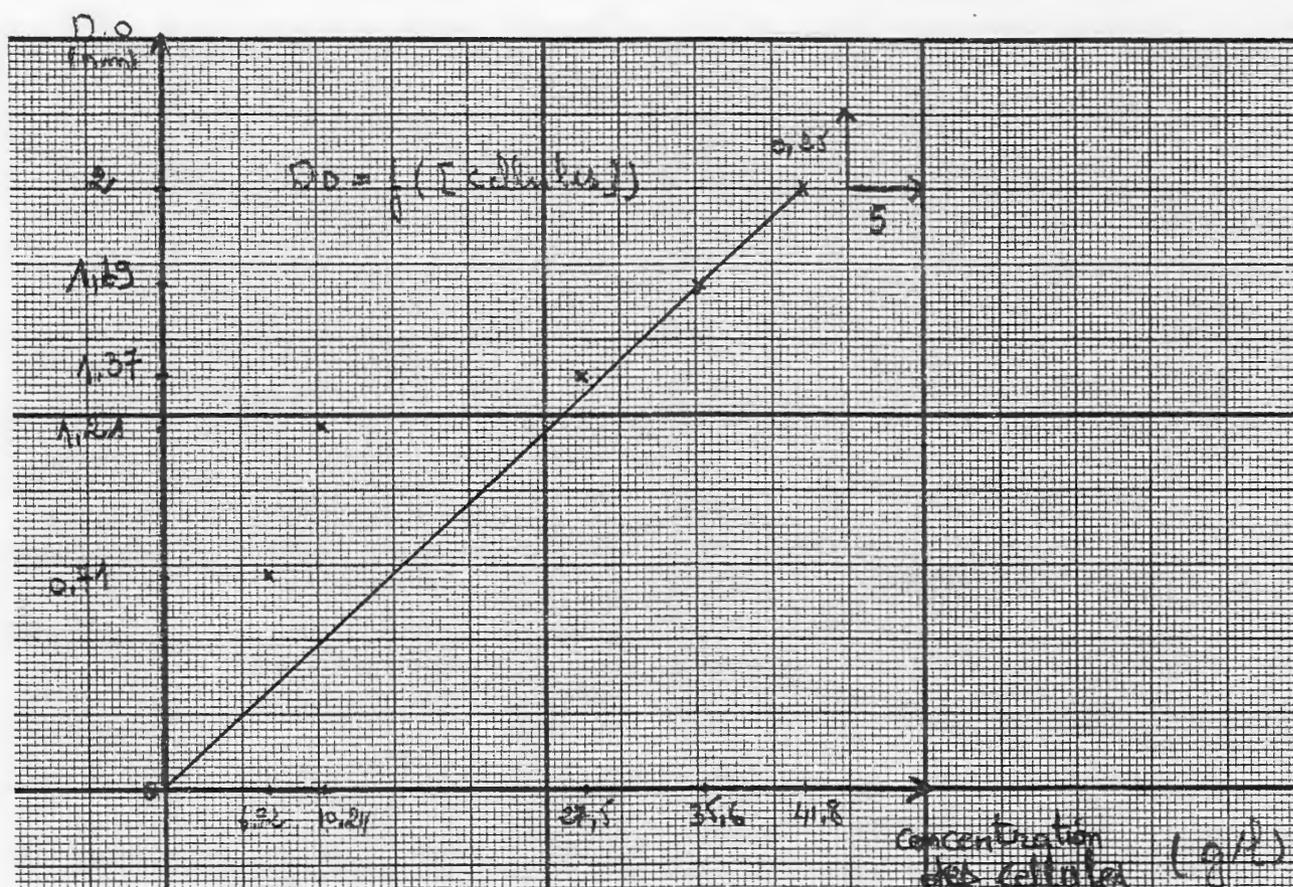


Figure 15 : courbe d'étalonnage : densité optique (à 660 nm) en fonction de la concentration en biomasse.

Il y a une relation de proportionnalité directe entre la densité optique et la biomasse formée.

Dans chaque type de milieu on effectue une série d'expériences à différentes concentrations, les résultats obtenus sont illustrés par des courbes.

A défaut des moyens, nous sommes limités à deux solutions de chaque milieu (lactosérum et glucose).

V-1 Fermentation sur milieu naturel à base de lactosérum :

Des prélèvements sont effectués chaque une heure, et une lecture au spectrophotomètre nous donne une estimation de la biomasse à partir de la courbe étalon.

Solution 1 : 0,5 g de levure dans un litre de lactosérum

Temps (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O (nm)	1.26	1.32	1.34	1.35	1.35	1.39	1.12	1.22	1.30
[cellules] (g/l)	27	27.75	28.25	28.5	28.9	29.3	23.4	25.4	27.5
PH	4.70	4.48	4.36	4.27	4.13	4.05	4.14	3.87	4.07

Solution 2 : 0.25 g de levure dans un litre de lactosérum.

Temps (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O (nm)	0.80	0.94	0.95	0.97	1	1.04	1.50	1.60	1.66
[cellules] (g/l)	17	19.8	20	20.4	21	21.8	31.75	33.75	35
PH	4.67	4.47	4.34	4.31	4.18	4.05	4.22	3.84	4.05

Les résultats des deux solutions sont illustrés par le graphe de la figure 16.

D'après les deux courbes de la figure 16 on peut choisir la courbe 2 car la croissance des levures dans la solution 01 est très faible.

L'examen de la courbe de croissance 2 montre que la phase de latence est longue, elle s'achève après une durée de trois heures et la phase exponentielle est aussi très longue elle a une durée de six heures, avec un temps de génération de sept heures et un taux de croissance : 0.14 h^{-1} .

On remarque une stabilité du PH du milieu.

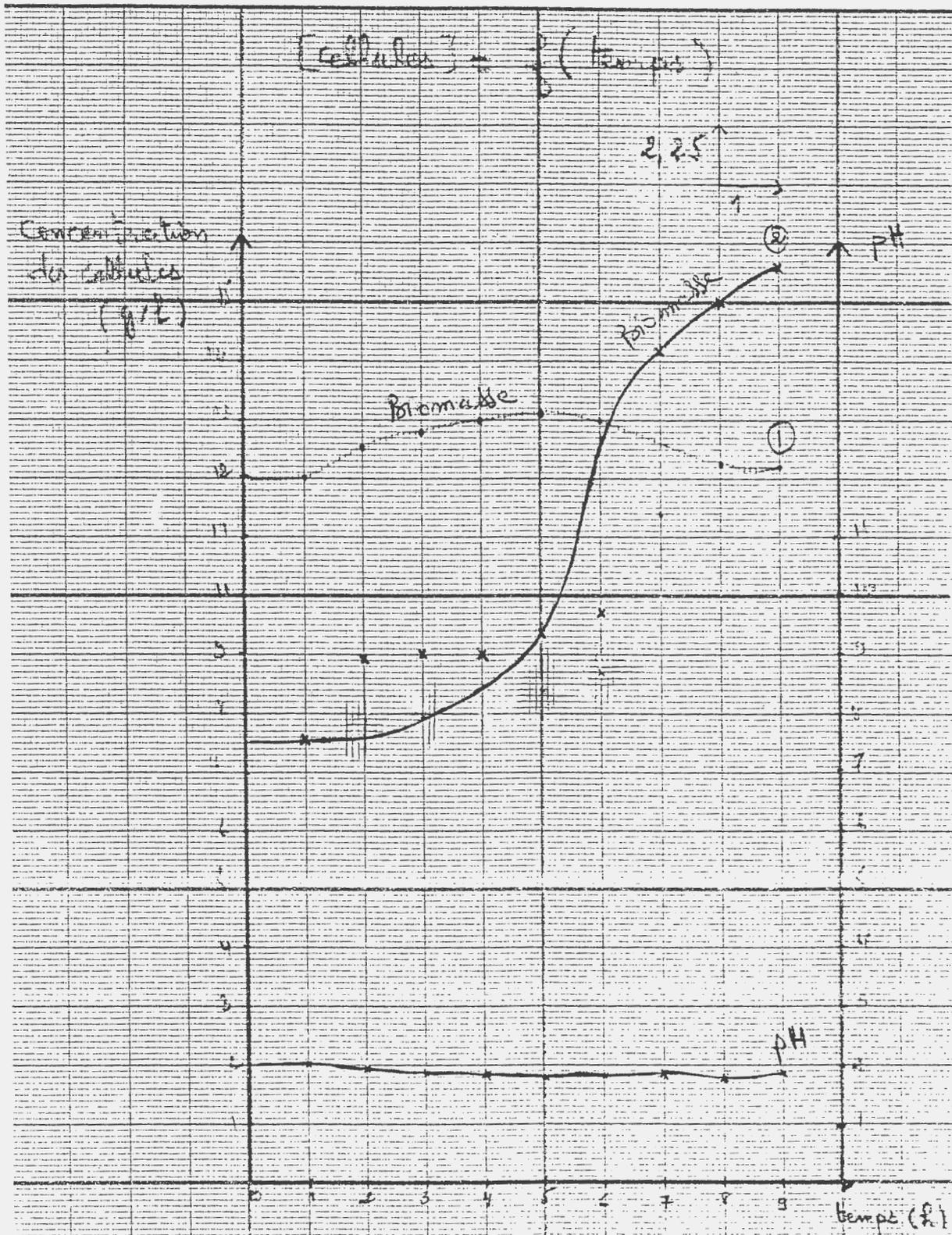


Figure 16 : croissance de *saccharomyces cerevisiae* sur milieu naturel à base de lactosérum en discontinu

Courbe 1 : solution 1 .

Courbe 2 : solution 2.

V-2- Fermentation sur milieu synthétique à base de glucose :

A des intervalles de temps égaux à 1 heure , une lecture au spectrophotomètre nous a permis d'estimer l'évolution de biomasse . Les résultats des deux solutions de concentration en glucose 20 g/l et 40 g/l en suspensions avec 0,5 g de levure par litre de l'eau distillée :

Solution 3 : 20g de glucose par litre d'eau distillée + 0,5 g de levure :

Temps (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O (nm)	0.71	0.88	0.97	1.01	1.08	1.15	1.16	1.23	1.35
[cellules] (g/l)	14.75	19.5	20.4	21	22.5	24.25	24	26	27
PH	5.80	5.29	5.36	4.58	4.70	4.07	3.11	3.59	3.20

Solution 4 : 40 g de glucose par litre d'eau distillée + 0.5 g de levure :

Temps (h)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D.O (nm)	0.67	0.87	1.02	1.09	1.15	1.23	1.28	1.33	1.45
[cellules] (g/l)	13.75	18.25	21.25	22.75	24.25	26	26.25	28	30.5
PH	5.90	5.33	5.40	5.08	5.20	4.10	4.80	3.92	4.12

Les résultats des deux solutions sont consignés sur la figure 17 .

La figure 17 montre que ces courbes présentent une bonne allure par rapport aux courbes de croissance sur le lactosérum.

On remarque que ces courbes est presque identique donc on peut choisir la courbe 4 avec les paramètres de croissance :

- phase de latence se termine au bout d'une heure .
- phase exponentielle prend fin après 8 heures .
- temps de génération de 6 heures et 42 mn.
- Taux de croissance : $0,15 \text{ h}^{-1}$.

La courbe du PH exprime une stabilité.

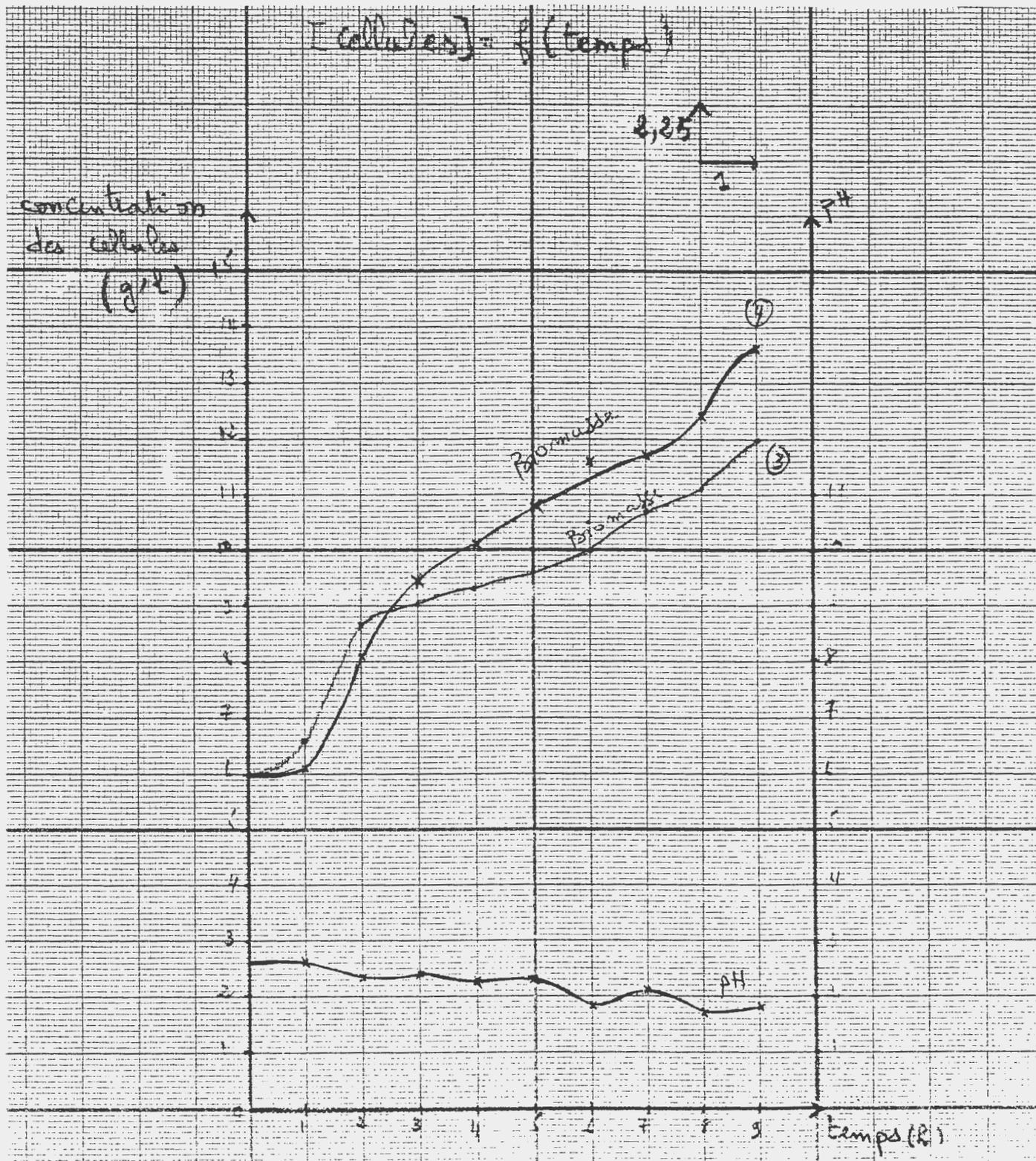


Figure 17 : croissance de *saccharomyces cerevisiae* sur milieu a base de glucose en discontinu.

Courbe 3 : solution 3 .

Courbe 4 : solution 4.

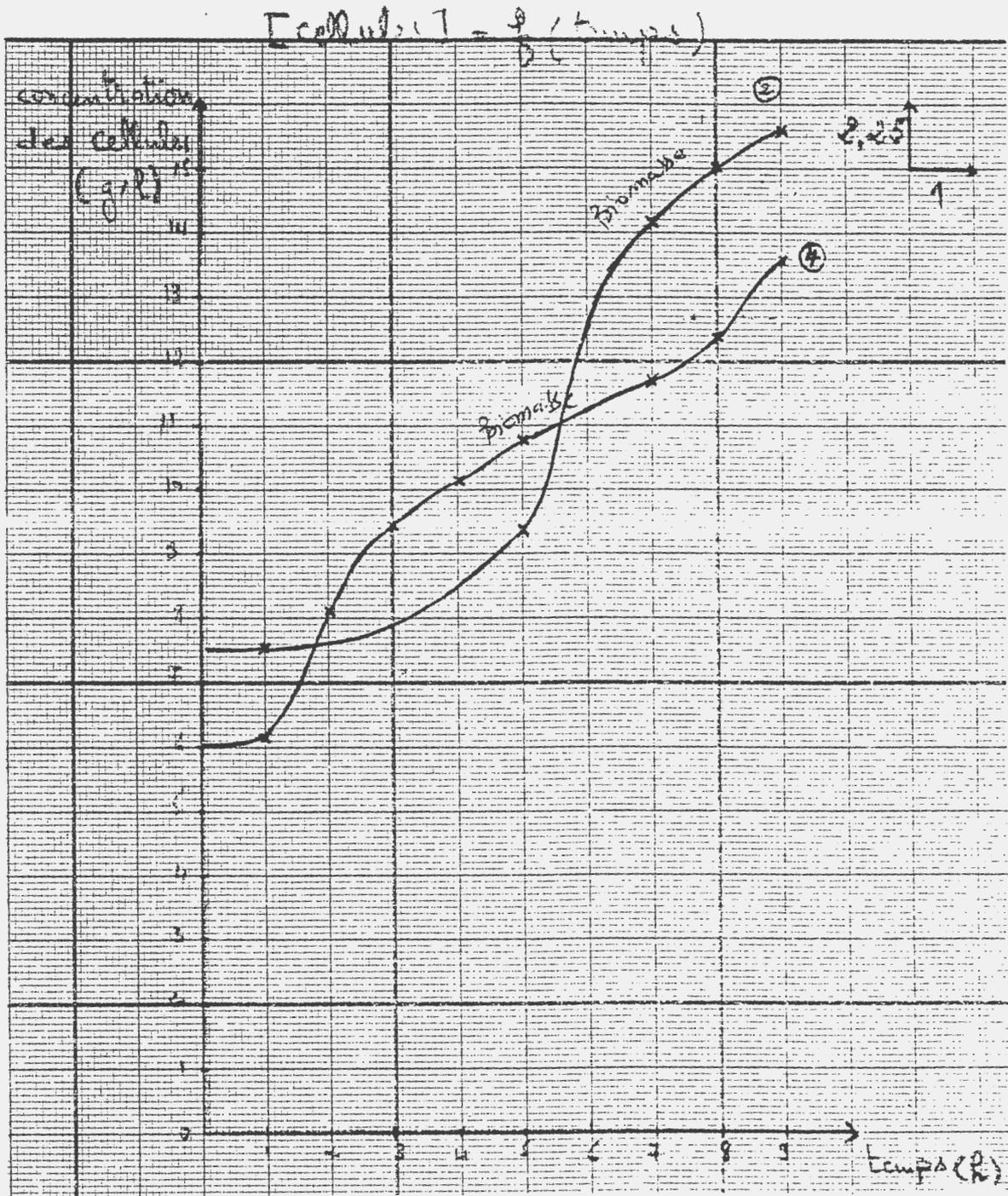


Figure 18 : comparaison des résultats .

2 : milieu a base de lactosérum .

4 : milieu a base de glucose.

V-3 Discussion :

La comparaison des résultats de croissance obtenus par fermentation sur erlenmeyer en batch des milieux , sont illustrées par le graphe de la figure 18.

La croissance sur milieu a base de glucose est beaucoup plus importante avec un temps de latence très court et un temps de génération est assez court par rapport à la croissance sur milieu naturel à base de lactosérum . Cela peut être expliqué par le fait que le premier milieu contient du glucose facilement assimilable par la levure (adaptation avec les conditions de milieu) , alors que le second milieu naturel contient une grande proportion du lactose . Ce diholoside hydrolysé par la β -galactosidase fournit du glucose et du galactose . Cette enzyme , n'existe pas chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais nous enregistrons une croissance sur ce milieu , cela peut être du à une répture de la liaison glucose-galactose soit sous l'effet de la chaleur de l'autoclave ou par l'activité des bactéries lactiques au moment de préparation du lactosérum.

En outre *Saccharomyces cerevisiae* possède des protéinases qui jouent un rôle catabolique de dégradation, notamment dans les conditions de carence azotée .(Botton 1990)[6].

Conclusion

A la lumière de notre étude bibliographique , on peut conclure que en fonction de leur équipement enzymatique , les levures peuvent se développer sur des substrats divers, en utilisant des polysaccharides comme source de carbone, les formes préférentielles de transport à l'intérieur de la cellule sont les sucres simples ou oses.

Cependant il a été montré chez *Saccharomyces cerevisiae* que le saccharose peut être transporté intact à travers le plasmalemme par un mécanisme de transport actif , d'autres diholosides tels que le maltose et le lactose et des tri holosides comme le maltotriose sont transportés à l'intérieur de la cellule et hydrolysés par des glycosidases (**Botton 1990**) [6].

Par ailleurs, **Achstetter et Wolf (1985)** , **Bussey (1988)**, ont identifié une quarantaine de protéinases chez *Saccharomyces cerevisiae* qui ont un rôle catabolique de dégradation non sélective des protéines , notamment dans des conditions de carence azotée.

En outre , il y a une connaissance approfondie du génome de *Saccharomyces cerevisiae* ; son amélioration industrielle est devenue facile.

L'objectif principal de notre travail est de mettre au point à l'échelle de laboratoire une cinétique de fermentation de levure de type *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu naturel à base de déchet industrielle « le lactosérum ».

Au cours de cette étude , nous avons montré que l'évolution de croissance est presque identique sur les deux milieux seulement on remarque une croissance importante sur le lactosérum ceci est due certainement à la richesse de ce substrat en source carbonée .

En résumé, en terme de ce travail , nous avons défini la valorisation d'un déchet industrielle pour la production de levures de types *Saccharomyces cerevisiae* , mais l'utilisation rationnelle de ce déchet fait l'objet de nombreuses perspectives à savoir :

- Réaliser des essais complémentaires en cultures continue en faisant tester le taux de dilution sur la production de biomasse de levure ;
- Proposition d'une technique de conduite optimale de la fermentation , en faisant des analyses complémentaires concernant l'éthanol et les autres métabolites secondaires tel que l'acétaldéhyde et l'acétate.

-A partir des résultats cinétiques , élaborer un model physiologique caractérisant le comportement des levures sur le milieu « lactosérum » dans différents mode de cultures (discontinu , continu ...).

- Passer au teste de la validité des aspects techniques de la conduite développé au laboratoire , en définissant un protocole expérimental pour réaliser un essai sur fermenteur pilote de 100 litres .

En fin, il s'agit bien d'un essai de recherche qui n'a nullement la prétention d'avoir cerner tous les problèmes qui constituent les préoccupation essentielles de notre études . Une réflexion complémentaire associée à des moyens mis à disposition permettra d'examiner les points qui sont à développer . Nous espérons avoir apporté une contribution non sans intérêt.

Bibliographie

- [1]-**ALLIET J.**(1997) ; cytobiologie. Ellipses edition marketing S A.
- [2]- **BIORON P.**(1996), organisation et biologie des champignons. Nathan université,P.37,70.
- [3]- **BOUFGRAS J.M. BONALY R. et LARPENT J.P.**(1991) ; Identification des levures. In biotechnologie des levures ,P. 177,182-183,194-200.
- [4]-**BONALY R.** (1991) ; Ultra structure des levures in biotechnologie des levures, P.4,6,9,14-16,19.
- [5]-**BONALY R.**(1991) ;ultra structures des levures in biotechnologie des levures , P.23- 24.
- [6]-**BOTTON B .**(1991) ; la physiologie des levures in biotechnologies des levures, P.98,104-105,110-111,113,120-121.
- [7]-**BOURGEOIS C.M. et LEVEAU J.Y.** (1980) ; Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries des Agro-alimentaire .(volume 3) Le contrôle microbiologique Lavoisier .Apria . Paris ,P.130,135-136.
- [8]- **BOURGEOIS C. M. et LARPENT J.P.** (1996) ; Microbiologie alimentaire . Tome 2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires . Lavoisier 2^{ème} édition .
- [9]- **DAKMOUCHE S.et BOUSBA R.**(1993) ; Etude comparative entre le lactosérum industriel et le lactosérum préparé au niveau de laboratoire par la thermocoagulation. En vue de la production de l'acide lactique.
- [10]-**DAVID J.C.**(1996) ;Biochimie métabolique. Paris.
- [11]-**DEMINIAC M.**(1991) ; utilisation des levures en fermentation alcoolique industrielle . in biotechnologie des levures ,P.337,341.
- [12]- **DJELLAL M.et TTILI A.**(1989) ; Etude sur la valorisation du lactosérum, mémoire d'ingénieur d'état en Agronomie .
- [13] -**DJIDEL-NACIB A.**(1997) ; transformation et valorisation de sous produit de datte en biomasse à partir *de Saccharomyces cerevisiae*, Thèse de magister.
- [14]- **DUTEURTRE et M. MOLL.** (1991) ; les levures et les boissons alcoolisées in biotechnologie des levures ,P.273,283,285,287.
- [15]-**E.BERVAS , S.GAWTHIER ,D.RICHARD – MOLARD et Y.VAYSSIER .** (1991) ; Rôle des levures dans les autres produits alimentaires in biotechnologie des levures .

- [16]-**ENGASSER J.M. et PONS M.N.**(1991) ; Les problèmes de génie biochimique liés à la culture des levures in biotechnologie des levures .
- [17]- **FIECHTER A. et al.**(1981) ; Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells .jn Djidel-nancib A, Thèse de Magister (1997) I.S.N .U. Constantine
- [18]- **GALZY P. et GUIRAND J.** (1980) ; L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires . Les éditions de l'usine ,P.53-55,57.
- [19]- **GUIRAND J.P.** (1998) ; Microbiologie alimentaire .Dunod Paris , P310.
- [20]- **HASLAY C. et LECLERC H.**(1993) ; Microbiologie des eaux d'alimentation Lavoisier .
- [21]-**LAMRI T.**(1991) ; contribution à l'étude des levures Methylotrophes ,mémoire d'ingénieur d'état .Uneversite de Sétif .
- [22]-**LARPENT J.P. et LARPEND G.** (1985) ; Element de microbiologie . Herman éditeurs des sciences des arts .
- [23]-**LARPEND. J.P. et LARPEND G.** (1997) ; Mémento technique de Microbiologie 3^{ème} édition .
- [24]- **LECLERC H.** (1975) ;Microbiologie générale .Edition Doin.
- [25]-**LECLERC H. et al.**(1979) ; Microbiologie appliquée .Edition Doin.
- [26]- **LECLERC H. Gaillard J.L et Simonet M.** (1995) ; Microbiologie générale .Doin éditeur .Paris.
- [27]- **LEVEAU J.Y. et BOUIX M.**(1993) ; Microbiologie industrielle. Lavoisier .Apria,P.8,10,13,15.
- [28]-**LIEVENSE J.C. et LIM H.C.** (1982); The growth and dynamics of *Saccharomyces cereviciae*. In Botton B physiologie des levures (1990).
- [29]- **MATALLAH S.** Contribution à la valorisation de la datte algérienne .
- [30]- **MOAT A.G. et FOSTEZR J.W.** (1988) : Carbohydrate métabolisme and energy production In microbial physiology ,P.118-220.
- [31]- **POL D.**(1996) ; Travaux pratiques de biologie des levures . Ellipes édition marketing SA ,P.5,9.
- [32]- **RAMAIAH A.** (1974) ; Pasteur effet and phosphofructokinase In Djidel-Nancib .A thèse de magister I SN U Constantine (1997).
- [33]-**ROUABAH A.** (1982); le lactosérum, Mémoire d'ingénieur en industries alimentaires.
- [34]-**SCRIBAN R.** (1988) ; Biotechnologie .Lavoisier ,P.45,46,58,59.

- [35]-**SCRIBAN R , ARNAUD A , LEVEAU J , GALZY P , THOMAS D** (1993) ;
Biotechnologie 4^{ème} édition .Londres New York. Lavoisier Paris ,P.40-42,52-
53,296.
- [36]-**TAOUCHE A .et MESSALLI A.**(1994) ; contribution a l'étude de l'influence
de quelques composants sur la production de biomasse de deux souches de
levures *Saccharomyces cerevisiae* et *candida albicans*.
- [37]-**TEBABKHA N. et ALLOUNE N.**(1992) ; L'effet des sels sur la croissance de
levure de Boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* .
- [38]-**THURIAUX P. et MOSRIN C.** (1991) ; La génétique moléculaire des levures
in biotechnologie des levures .
- [39]-**YAICI R. et GHZGHOUZ Y.**(1990) ; Contribution a l'amélioration des
condition de conservation de la souche « *Saccharomyces cerevisiae* » mémoire
d'ingénieur d'état.
- [40]-Résultat des analyses effectuées par : « Stazione Sperimentale par L'industrie de
la conserve alimentari » cite par L'office national de la dattes Biskra.1991.

Les sites internet/

- [41] -travaux pratiques de biologies des levures .
[www.users.imagnet.fr/~pol/5AVPRPOS.html](http://www.users.imaginet.fr/~pol/5AVPRPOS.html) - 20k -
- [42]Le lactosérum.
[http://www.calixo.net/braun/produit/lait/lactoserum.](http://www.calixo.net/braun/produit/lait/lactoserum.htm)
Htm-13K. Arohive memoire. google.
- [43]-Saveurs du monde nous explique la mélasse .
<http://saveurs.sympatico.ca/ency-8/sucre /mélasse.htm>
- [44]-Les sous produits de la canne.
[http://www.hello-caribbeau.com/hello19/canne6.htm.](http://www.hello-caribbeau.com/hello19/canne6.htm)
- [45]-levure de bière vivante palmer.
[File://A:\levure de bière vivante palmer plus que la levure alimentaire .htm.](http://File://A:\levure de bière vivante palmer plus que la levure alimentaire .htm)
- [46]-utilisation de la levure par l'homme .
[htt://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/chapo3-10html.](http://cgdc3.igmors.u-psud.fr/microbiologie/chapo3-10html)
- [47]composition de mélasse de canne et de betterave.

[http://www.vinasse.com/seite 1html.](http://www.vinasse.com/seite1.html)

[48]-L'histoire de l'industrie du sucre

[http://www.globetrotter.net/futur simple/archives/sucre. Html.yahoo2001.](http://www.globetrotter.net/futur simple/archives/sucre.Html.yahoo2001)

[49]-melasse sèche.

[http://www.jefo.ca/ficher-fran%80ais/melasseblack strap. html.google2000.](http://www.jefo.ca/ficher-fran%80ais/melasseblack strap.html.google2000)

[50]- www.ac-toulouse.fr/svt/eleves/Dastugue/florie/florie.htm - 4k

<u>Présenté par :</u>	<u>Thème :</u>	<u>Date de soutenance</u>
- DJIHEL Nadjoua - DEHMECHE Massika - REKROUK Ghania	Contribution à l'étude de la cinétique de croissance de la levure : <i>saccharomyces cerevisiae</i> sur milieu naturel " le lactosérum"	08 /10/2001

RESUMÉ

La levure *saccharomyces cerevisiae* est un micro-organisme très utilisé pour la recherche scientifique, il a une importance considérable du point de vue économique surtout dans l'alimentation.

Notre contribution à l'étude de la cinétique de production de biomasse de *saccharomyces cerevisiae* vise à mettre en valeur un déchet industriel qui est le « lactosérum » comme substrat pour la croissance de ce micro-organisme.

Les résultats obtenus sont satisfaisants du point de vue économique et ce ci en comparaison avec un milieu artificiel à base de glucose.

SUMMARIZED

Yeast *saccharomyces cerevisiae* is a microorganism very used for the scientific research, it especially has a considerable importance of the economic view point in the feeding.

Our contribution to the survey of the kinetics of production of *saccharomyces cerevisiae* biomass aims has put in value an industrial loss that is the «lactosérum» as substratum for the growth of this microorganism.

The gotten results are satisfactory of the economic view point and this in comparison with an artificial middle has basis of glucose.

ملخص

تعتبر خميرة الخبز *saccharomyces cerevisiae* من أهم الكائنات المجهرية الأكثر استعمالاً في مجال الأبحاث العلمية نظراً لأهميتها الاقتصادية البالغة خاصة في التغذية.

من خلال الدراسة التجريبية التي قمنا بها والتي تتمثل في إيجاد طريقة لإنتاج الخميرة وذلك بإعادة استغلال مصلى الحليب لاحتوائه على العناصر الضرورية لنموها. هذا الأخير هو في الأصل عبارة عن فضلات تطرح خارج مصانع الحليب ومشتقاته.

ولكن بالرغم من أن إنتاج خميرة *saccharomyces cerevisiae* على مصلى الحليب لا يكون بنفس المرادوية مقارنة بإنتاجها على الأوساط الأخرى المستعملة إلا أنه يمكن اعتبارها عملية ذات أهمية اقتصادية معتبرة.

Les mots clés : *saccharomyces cerevisiae* – fermentation – respiration-
croissance – biomasse- lactosérum – glucose .

ENCADRE PAR : MR. BOULDJEDRI MOHAMED