

République algérienne Démocratique et Populaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Centre Universitaire Abdelhak BENHAMOUDA
JIJEL

المركز الجامعي عبد الحق بن حمودة - جيجل

Institut des Sciences de la Nature

معهد علوم الطبيعة

MB.02 / 02

جامعة محمد السادس
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
العدد : 244

Mémoire

En Vue de l'Obtention du
Diplôme des Etudes Supérieures (DES)
En Biologie

Option : Microbiologie

Thème

Contribution à l'Etude de la Cénitique de la
Croissance de la Levure *Saccharomyces cerevisiae*
sur Milieu Naturel à Base de « GHARS »

Réalisé par :

BELHIMEUR Yacine
BOUHCHICHA Loubna
SAADNA Fatima Elzohra

Dirigé par :

M. BOULDJEDRI Mohamed

Remerciements

Nous tenons à remercier notre promoteur MR, BOULDJEDRI Mohamed Qui nous a apporté l'aide Considérable dans l'élaboration de ce travail.

Nous remercions aussi tous les responsables et les enseignants de l'institut de Biologie 'Université de JIJEL'.

Nous remercions également les responsables du laboratoire de l'institut de Chimie.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous aident à réaliser ce modeste travail et particulièrement le gérant du Cybercafé « NSII », Said D.

Yacine, Loubna, Fatma

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Généralités sur les levures

I-1. Définition.....	2
I-2. Caractères Morphologiques des levures.....	2
I-2-1. La forme levure.....	2
I-2-2. La forme pseudo-mycélium.....	2
I-2-3. La forme mycélium.....	2
I-2-4. La sporulation.....	3
I-3. Cytologie et organisation.....	3
I-4. Les constituants des levures.....	3
I-5. Reproduction.....	3
I-5-1. Reproduction asexuée.....	3
I-5-1-1. Bourgeonnement.....	3
I-5-1-2. Formation d'une paroi transversale.....	3
I-5-2. Reproduction sexuée.....	5
I-5-2-1. Le cycle de vie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
I-6. Classification des levures.....	5
I-7. Caractères d'identification.....	6
I-8. Aptitude à la fermentation.....	8
I-9. Rôle des levures.....	8

Chapitre II : Aspect Biochimique des levures

II-1. Le métabolisme chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
II-1-1. Voie de la glycolyse (EMB).....	11
II-1-2. Voie des hexoses monophosphates (HMP).....	11
II-1-3. Cycle de Krebs.....	11
II-2. Facteurs influençant le métabolisme de <i>s.cerevisia</i>	12
II-2-1. L'effet Pasteur.....	12
II-2-2. Effet crabtrée.....	12
II-2-3. Effet de l'éthanol.....	12

Chapitre III : Déchets Industriels Utilisés pour la Production de Biomasse

III-1. La mélasse.....	15
III-1-1. Définition.....	15
III-1-2. Mélasse de canne à sucre.....	15
III-1-3. Mélasse de betterave.....	15
III-2. Milieux naturels à base de déchet de datte.....	16
III-2-1. Compositions chimiques.....	17
III-2-1-1. Humidité.....	17
III-2-1-2. Sucres.....	17
III-2-1-3. Protéines et Lipides.....	17
III-2-1-4. Tanins.....	17
III-2-1-5. Fibres brutes.....	18
III-2-1-6. Substances pectiques.....	18
III-2-1-7. Amidon.....	18
III-2-1-8. Vitamines et minéraux.....	18
III-2-1-9. Enzymes.....	18
III-2-1-10. Autre composés.....	18

Etude Expérimentale

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV-1 Matériels nécessaires.....	19
IV-2. Etapes de travail.....	19
IV-2-1. Traitement du Ghars.....	19
IV-2-2. Préparation des milieux synthétique.....	20
IV-2-3. Etalonnage de l'appareil.....	20
IV-2-4. Le suivi de croissance.....	21
IV-2-5. Détermination du pH.....	21

Chapitre V : Résultats & Discussion

V-1-Etalonnage du spectrophotomètre.....	22
V-2-Evolution de la croissance sur milieu naturel et Synthétique.....	23
a). Milieu naturel.....	23
b). Milieu synthétique.....	24
c). Comparaison de résultats sur le milieu naturel et synthétique..	25
V-3. Discussion.....	26

Conclusion

Bibliographie

Introduction

L'industrie agroalimentaire génère d'importante quantité de déchets. Le secteur phoenicole algérien, en particulier fournit à chaque campagne près de 60.000 tonnes de déchets. [2]

Par ailleurs, de nombreux essais expérimentaux ont montré que les déchets de dattes quoique déficients en matières azotées sont dotés d'une teneur élevée en sucre. Le noyau lui-même peut être exploité, il contient d'ailleurs d'avantage de lipides et de protéines que la pulpe et contient aussi des éléments minéraux. [2], [8]

Les dattes de part leur grande richesse en sucre et leur conservation relativement longue offrent de nombreuses possibilités technologiques suivant le traitement auquel elles sont soumises.

En effet, elles peuvent servir en tant que substrat de fermentation pour la production de biomasse et de divers métabolites tels que l'acide citrique, l'éthanol...etc. toutefois, dans le domaine d'une production à l'échelle industrielle, il faut que le procédé de transformation de la matière première soit rentable en maximisant le rendement de conversion du sucre en biomasse.

L'objectif principal de notre travail a donc été fixé dans ce contexte et porte sur la valorisation de dattes Ghars pour la production de biomasse de levure du type *Saccharomyces cerevitiae* cette étude est présentée en deux parties :

Dans une première partie, une revue bibliographique présente l'essentiel de l'état des connaissances sur d'une part la souche utilisée, les mécanismes de dégradation des glucides ainsi que la cinétique de croissance en fermenteur discontinu, d'autre part, la datte son origine sa composition et les différents substrats utilisés pour la production de biomasse.

Dans une deuxième partie, présentation des résultats de suivi de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu naturel à base de Ghars et milieu synthétique et nous terminons par une conclusion générale et des perspectives.

CHAPITRE I

Généralités
sur les levures

CHAPITRE I

Généralités sur les levures

I-1. Définition

Les levures sont des champignons supérieurs unicellulaires qui n'ont pas la propriété de former un mycélium coenocytique. Ils sont largement distribués dans la nature. [16] ,[21]

I-2. Caractères Morphologique des Levures

La structure générale de la levure est celle de la cellule végétale. Mais elle ne peut pas utiliser directement l'énergie solaire. Les organes de certaines champignons sont visibles à l'œil nu, mais l'utilisation du microscope est importante pour l'observation des variétés d'organes associées à la fructification, en particulier sexuée a condition à d'établir prioritairement une classification représente sur ces caractères. [26]

I-2-1. La Forme Levure

C'est la plus simple des appareils végétatifs. Apparaissent sphérique, ovoïde cylindrique, apiculée. [7] La taille est très variable 1 à 10 μm de large. Contre 2-3 μm ou 20-50 μm de longueur. Les dimensions et l'aspect peuvent varier considérablement en fonction de l'environnement. [30]

Chez *Saccharomyces cerevisiae* les cellules végétatives habituellement libres est isolées, sont immobiles, rigides ; En bourgeonnement les cellules peuvent rester attachées et forment un pseudo-mycélium. [20][34]

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, la production de certain pseudo-mycélium est favorisé par l'anaérobiose. [7]

I-2-3. La Forme Mycélium

Certains espèces des levures ont la propriété de donner vrai mycélium séparé par des cloisons ou septa. [7]

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. [26]

I-3. Cytologie et Organisation

La cellule de levure est limitée par une paroi, d'épaisseur de 150 à 230nm riches en polysaccharides antigéniques, en chitine et en protéines dont certaines sont des enzymes. La membrane plasmique d'épaisseur moyenne et de 7,5nm qui est constituée des stérols (protéine et lipides). Le cytoplasme contient des nombreux organes (vacuoles, ribosomes et des mitochondries) [1][15], (voir figure1).

I-4. Les Constituants des Levures

La levure aliment caractérisée par une forte teneur en protéines, acides nucléiques, en vitamines (E, D2 et C), les glucides, les sels minéraux, les acides nucléiques. [13]

I-5. Reproduction

Les levures ont un mode de multiplication spécial, qui combine reproduction sexuée (sporulation) et reproduction asexuée (bourgeonnement) de plus, les populations de levures connaissent un cycle de vie complexe. [28]

I-5-1. Reproduction Asexuée

I-5-1-1. Bourgeonnement [28]

Le bourgeonnement est une forme particulière de division cellulaire au cours du quel l'enveloppe nucléaire ne disparaît pas, il divise le noyau en deux ; une moitié du noyau s'installe dans la cellule mère, l'autre moitié dans la cellule fille. Les bourgeons ou cellules filles peuvent alors se détacher, grossir encor, puis bourgeonner à son tour. On peut différencier la cellule mère par la présence d'une cicatrice à l'endroit de la formation des bourgeons. (voir figure 02) [28]

I-5-1-2. Formation d'une Paroi Transversale (Fission)

Observer chez les levures unicellulaires du genre *Schizosaccharomyces*, et chez les cellules filamenteuses par formation d'une cloison transversale (septum). [7]

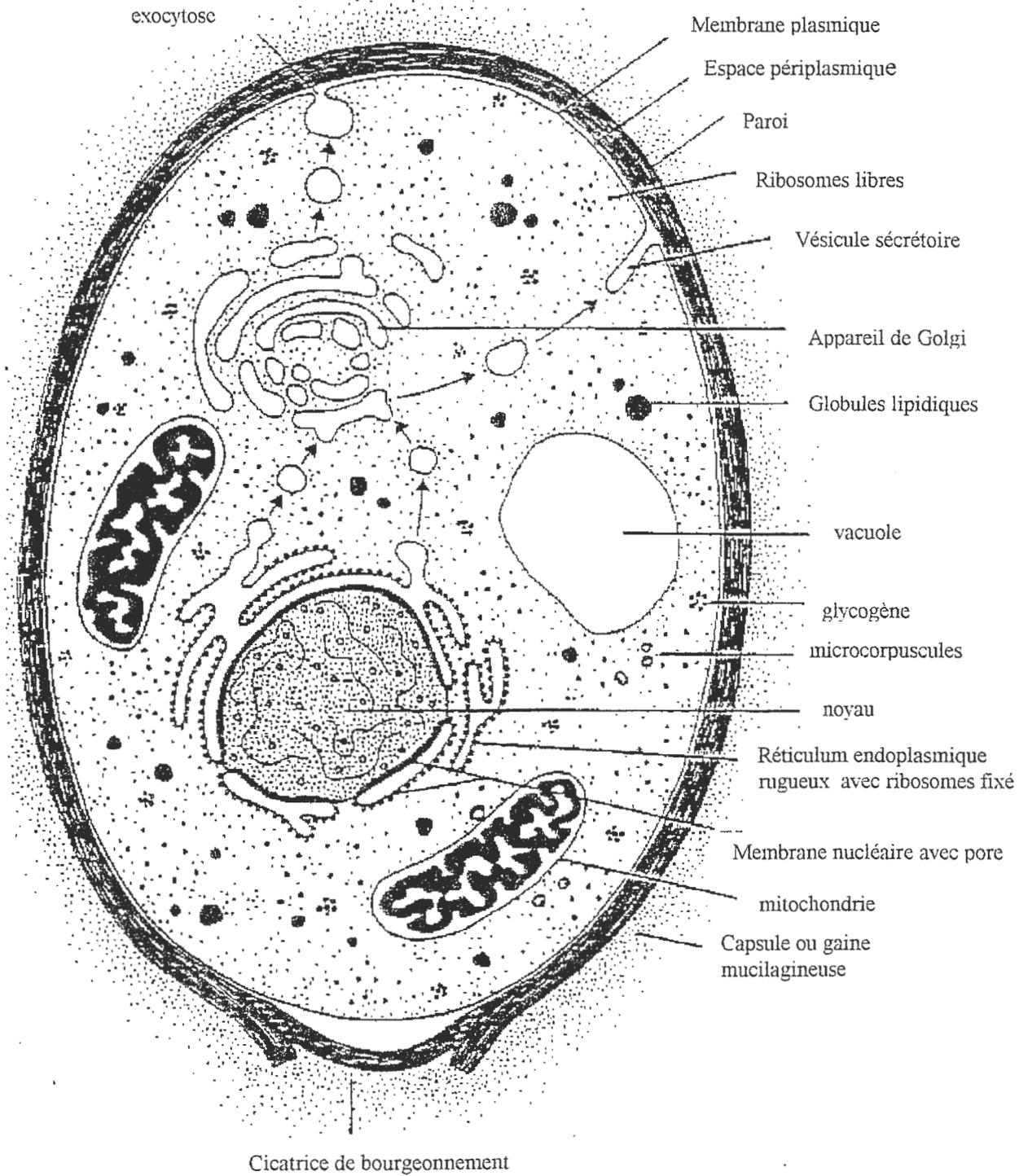


Figure 01 : Schéma d'une cellule de levure [7]

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 haploïde donnant un zygote diploïde. Par l'intermédiaire d'une méiose forme des spores haploïdes. [28]

I-5-2. le cycle de vie de *Saccharomyces cerevisiae* (figure 3) [20]

Comme chez les autres organismes le cycle de reproduction sexuel 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 forme une cellule transitoire, le zygote qui peut retourner à l'haplophase par méiose et sporulation.

La diplophasie est très stable chez *Saccharomyces cerevisiae* où la sporulation est spécifique à des milieux définis, riches en acétate pauvre en nutriment. [28]

I-6. Classification des Levures

Les levures ne forment pas un groupe systématique homogène du point de vue taxonomique, selon : Kreger-Vanrij. Il existe 60 genres et 500 espèces, repartis dans les trois groupes de champignons supérieurs, les Ascomycètes, des Basidiomycètes et les Deutéromycètes (champignons imparfaits) [19][18] On distingue des levures vraies celles qui produisent des spores appelées (levures sporogènes) et levures imparfait (levures fausses) ne produisant pas des spores. [28]

Le premier cas se sont des Hémiascomycetes(levures ascosporegènes) soit des Basidiomycètes (levures basidiosporogènes) le second cas ce sont les Deutéromycetes. [28]

a- Les levures Ascomycètes : Forment la famille de Saccharomycetaceae. [15]

b- Les levures Basidiomycetes : Forment la famille de Sporobolomycetaceae. [15]

c- Les levures deutéromycètes : Forment la famille de Cryptococcaceae. [15]

Tableau I: Classification de *Saccharomyces cerevisiae* [19]

division	Subdivision	classe	Sous classe	ordre	famille	Sous famille	genre	Espèces
Amastigomycota	Ascomycotina	Ascomycètes	Hémiascomycètes	Endomycetales	Saccharomycetaceae	Saccharomycetoideae	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

I-7 Caractères d'Identification

Des certains nombres de critères employés pour l'identification sont :

a) Caractères Cultureux

Il s'agit d'examiner l'aspect des cultures en milieu liquide et sur milieu solide les *saccharomyces cerevisiae* peuvent être mises en évidence sur le milieu WLM au WLD (wallerstein nutrient en wallerstein différentiel) contenant du vert de bromocresol.

Les boitesensemencées sont incubées à 25°C durant 3 jours, seules les souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont incapables de réduire le colorant et forment des colonies lisses. [15]

b) Caractères Morphologiques

Permettent de définir le genre et peuvent être noté l'examen microscopique, l'importante variété d'organes associer à la fructification, en particulier sexué à conduit à établir prioritairement une identification représentée sur :

- la forme (la taille) ;
- Le mode de reproduction ;
- Organisation des cellules.
-

c) Caractères Physiologiques

1) Les activités biochimiques :

- Utilisation des divers substrats carbonés ;
- Pouvoir fermentaire ;
- Exigences en facteurs de croissances.

2) d'autres caractères peuvent être étudiés :

Par exemple la recherche d'une uréase, l'assimilation du nitrate de potassium. [31]



Figure 02 : Cellule de *Saccharomyces Cerevisiae* en Bourgeonnement X 370000 [28]

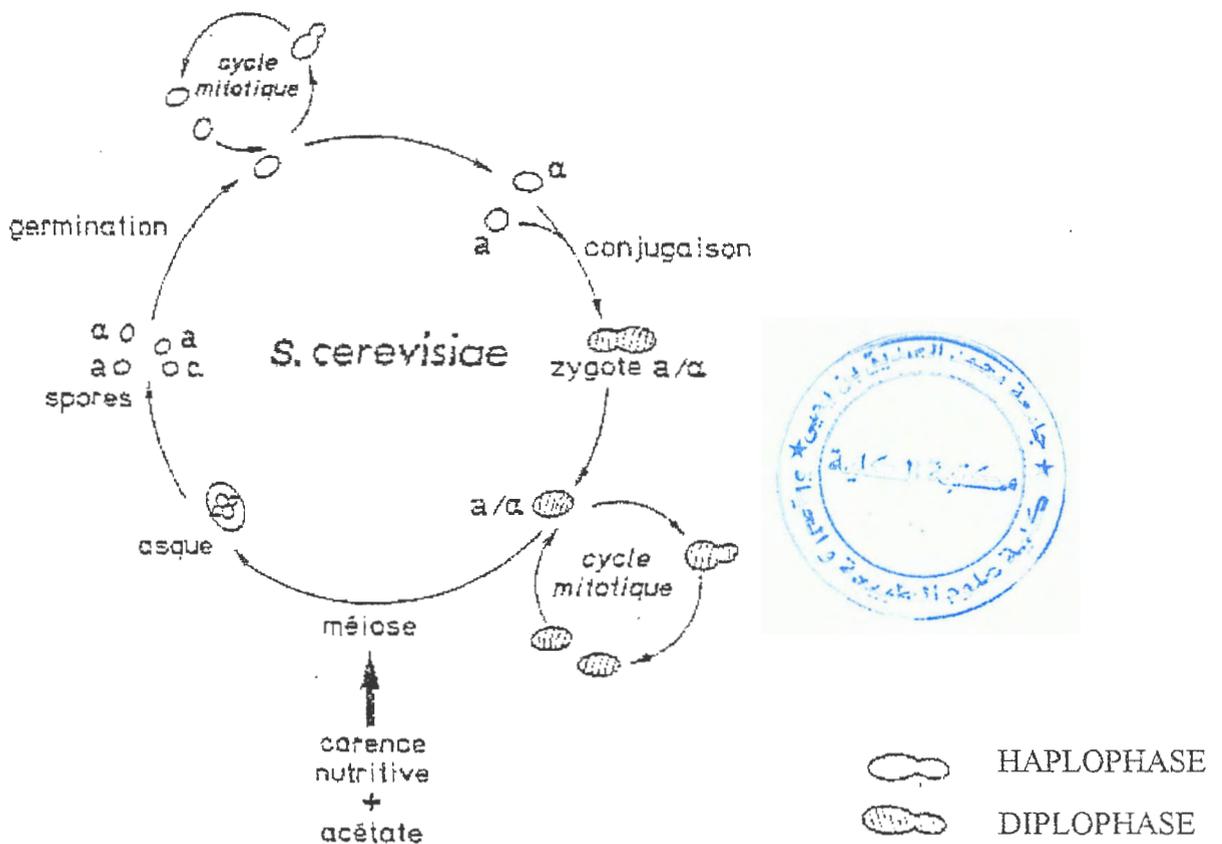


Figure 03 : Cycle de Vie de *Sacchromyces cerevisiae* [20]

I-8. Aptitude à la Fermentation

La chaîne glycolytique s'arrête au pyruvate dont le sort dépend des cellules dans lesquelles il est formé et les conditions dans lesquelles elles se trouvent. Le pyruvate constitue en effet une plaque tournante vers de multiples métabolismes. Un point doit cependant être souligné, pour que la chaîne glycolytique puisse fonctionner, il faut que le coenzyme réducteur NADH, soit réoxydé pour pouvoir rentrer à nouveau dans la réaction. Ce processus est réalisé en aérobiose par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire, ce qui peut se faire également en anaérobiose par des réactions terminales correspondant aux fermentations chez les levures, du fait de la répression catabolique due à de nombreux sucres, les mécanismes fermentaires ont également lieu en présence d'oxygène. [19]

I-9. Rôle des Levures

Les levures sont hétérotrophes à métabolisme mixte parmi lesquelles on distingue les levures basses qui descendent au fond du fermenteur, après la période d'activité et les levures hautes qui se regroupent ensemble et restent à la surface après fermentation. Et peuvent être séparées facilement de leur milieu tel que *Saccharomyces cerevisiae*.

Ces levures occupent une place importante dans :

- L'industrie alimentaire (brasserie, cidrerie, vinification, fromagerie)
- La revalorisation des déchets agricoles et industriels.
- La production des protéines de hautes qualités destinées à l'alimentation humaine et animale.
- La production du glycérol, des enzymes, ainsi que certaines vitamines et solvants.
- La panification surtout *saccharomyces cerevisiae* qui en se développant à partir des hydrates de carbone constituant les pâtes, libère du CO₂ qui entraîne la levée de la pâte.
- Par ailleurs, vu la richesse de leurs enveloppes en protéines, vitamines, ...etc. Ces levures ont été utilisées dans les nutriments destinés à l'alimentation du bétail. [17]

La figure 4, montre les différents domaines d'utilisation de la fermentation.

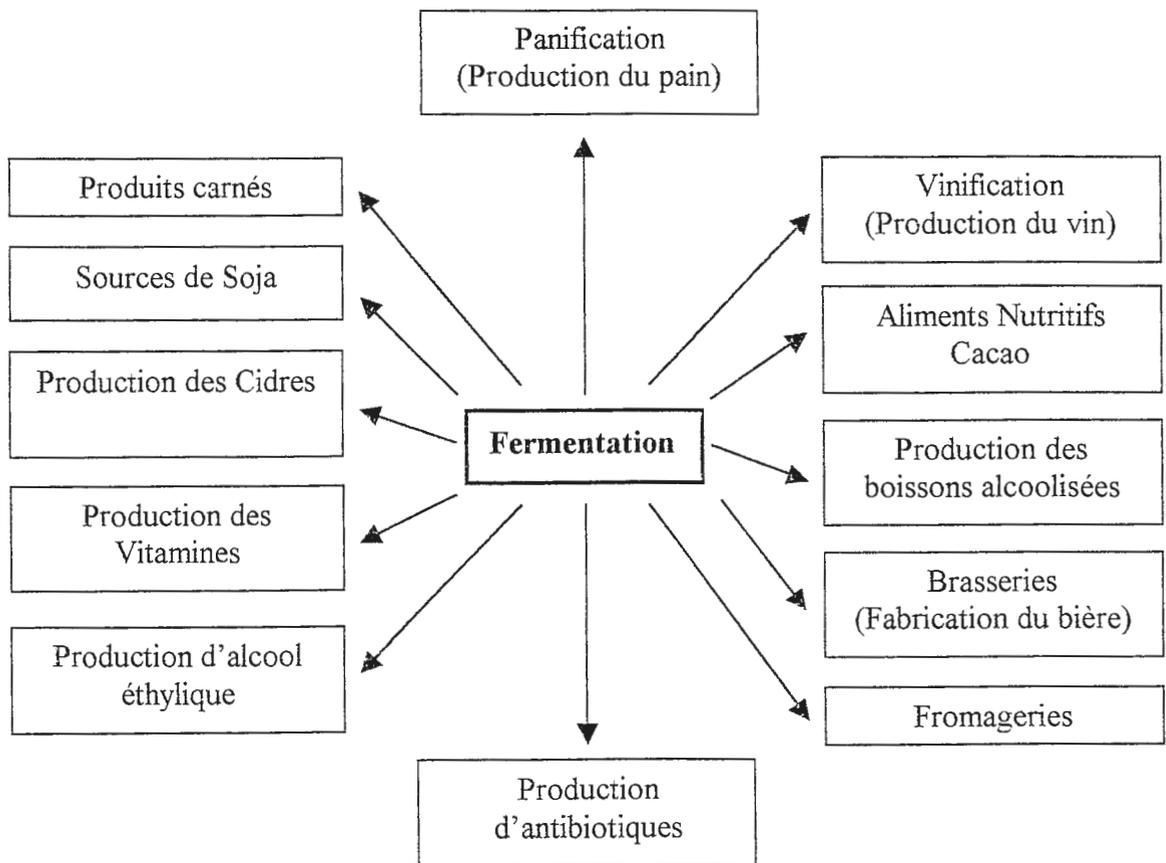


Figure (4) : Schéma des différents domaines d'utilisation de la fermentation des levures. [6] [10] [14] [31]

CHAPITRE II

Aspect Biochimique
Des Levures

CHAPITRE II

Aspect Biochimique Des Levures

Les sucres carbonés sont d'une grande importance pour les champignons puisqu'elles fournissent le carbone exigé pour la biosynthèse de constituants cellulaires variés tels que les glucides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, ect... et leur oxydation fournit l'énergie à la cellule, la voie de dégradation des glucides étant la glycolyse qui convertit les sucres en pyruvate, l'entrée dans cette voie varie selon le glucide tandis que la destinée du réferant ou catabolisme du pyruvate formé à partir du glucose.

II-1. Le Métabolisme Chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les hydrate de carbone sont habituellement utilisés comme source d'énergie c'est pourquoi l'étude des mécanismes de la dégradation de ces composés reste l'objet de nombreux travaux, quelque soit le processus envisagé, la levure catabolise les hydrates de carbone, a fin de produire de l'énergie (ATP) et des métabolites nécessaires aux différentes biosynthèses, et vue qu'elle possède un métabolisme mixte, *saccharomyces cerevisiae* dégrade le glucose suivant deux processus.

a) Fermentation du glucose

Dans des conditions d'anaérobiose, il y a une dégradation partielle du substrat avec un rendement énergétique faible. [15]



b) Oxydation du glucose

En présence d'oxygène et une faible concentration en substrat : C'est une respiration générant de l'ATP, avec un grand rendement de l'ordre de 16 à 38 moles d'ATP/mole de glucose oxydé.

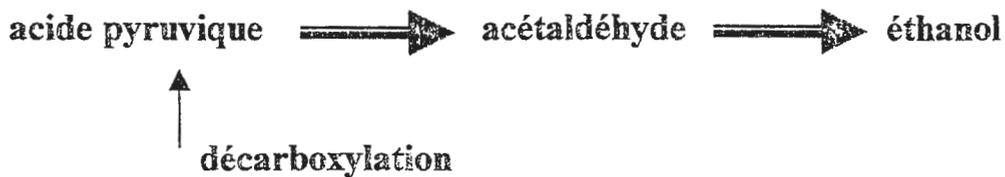


Pour subvenir à ces besoins nutritionnels et énergétiques, *Saccharomyces cerevisiae*, fait recours à différentes voies cataboliques lui

permettant de dégrader le glucose selon les deux processus précédents. dont les principales étapes sont:

II-1-1. La voie de la glycolyse (EMP)

La caractéristique de cette voie est la coupure du fructose 1,6 diphosphate dont la dégradation de chaque molécule peut assurer la formation de quatre molécules d'ATP, ces réactions aboutissent à la formation d'acide pyruvique, la présence d'oxygène n'était pas obligatoire pour la plus part des micro-organismes. Toutefois chez *saccharomyces cerevisiae* l'absence d'oxygène provoque la formation d'éthanol selon le schéma suivant:



Cette réaction est effectuée par l'intervention de deux molécules de NADH₂ produites par la glycolyse. Dans ce cas la voie de réduction du pyruvate en éthanol, est importante pour la génération du NAD qui est un cofacteur nécessaire à la voie d'EMP. (Voir figure 5) [32]

II-1-2. La Voie des Hexoses Monophosphates (HMP)

La particularité de ce cycle, un hexose est d'abord dégradé puis recombinaison pour fournir des oses phosphates à 3,4,5,6, atomes de carbones.

Aussi sur six molécules de glucose mises en oeuvre cinq sont transformées, tandis que seule la dernière est oxydée en acide carbonique. Ce cycle permet aussi la formation du NADPH₂ (alors que la voie d'EMP ne fournit que du NADH₂), nécessaires à certains mécanismes d'oxydoréduction. Du point de vue rendement énergétique, il est moins élevé que la voie d'EMP de l'ordre d'une molécule d'ATP. (voir figure 6) [32]

II-1-3. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs encore appelé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tri-carboxyliques, se déroule dans les mitochondries. [9]

Un grand nombre de micro-organisme comblent leurs besoins énergétiques par oxydation du pyruvate, ce lui-ci est d'abord oxydé en acétyl COA puis entre dans une séquence cyclique de réaction appelée cycle de Krebs, l'acétyl COA est oxydé en CO₂ et les atomes d'hydrogène sont transférés vers des enzymes transporteurs d'électrons (NADH + H⁺, FADH₂) la fonction énergétique de cycle est liée à l'oxydation des coenzymes réduites par l'oxygène dans la chaîne respiratoire productrice d'ATP.

II-2. Facteurs Influençant le Métabolisme de *Saccharomyces cerevisiae*

II-2-1. L'effet pasteur

L'effet pasteur est défini comme étant l'inhibition du fonctionnement des enzymes fermentaires sous l'influence de l'oxygène de l'air qui se traduit par une diminution de consommation du substrat et production du CO₂, le passage du métabolisme anaérobie au métabolisme aérobie affecte la composition enzymatique de la cellule, ainsi que l'activité de certaines enzymes, dans ce cas la consommation du substrat est réduite et l'énergie disponible pour la croissance augmente.

Des études ont montré que le métabolisme de *saccharomyces cerevisiae* est perturbé par des pressions partielles en oxygène élevées. En effet, une aération avec 65% d'oxygène rend les levures incapables d'oxyder le glucose. [17]

II-2-2. Effet Cabtrée

L'effet cabtrée est l'inhibition de la synthèse des enzymes respiratoires sous l'influence d'une forte concentration en sucre fermentescibles, dit aussi d'effet glucose qui apparaît comme étant le type de répression catabolique de la voie oxydative productrice d'énergie par le glucose ou métabolites dérivés du glucose.

Dans le cas de *saccharomyces cerevisiae*, l'activité du métabolisme respiratoire dépend de la concentration du substrat dans le milieu. Dans le cas où la levure est cultivée sur un substrat non fermentescible (acide lactique par exemple). L'activité respiratoire reste élevée pendant toute la croissance. [17]

II-2-3. Effet de l'éthanol

La répression catabolique est le faible taux d'oxygène dans le milieu réactionnel favorisent la formation de l'éthanol.

L'éthanol formée, 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 sa accumulation ou de sa réassimilation par les micro-organismes. [13]

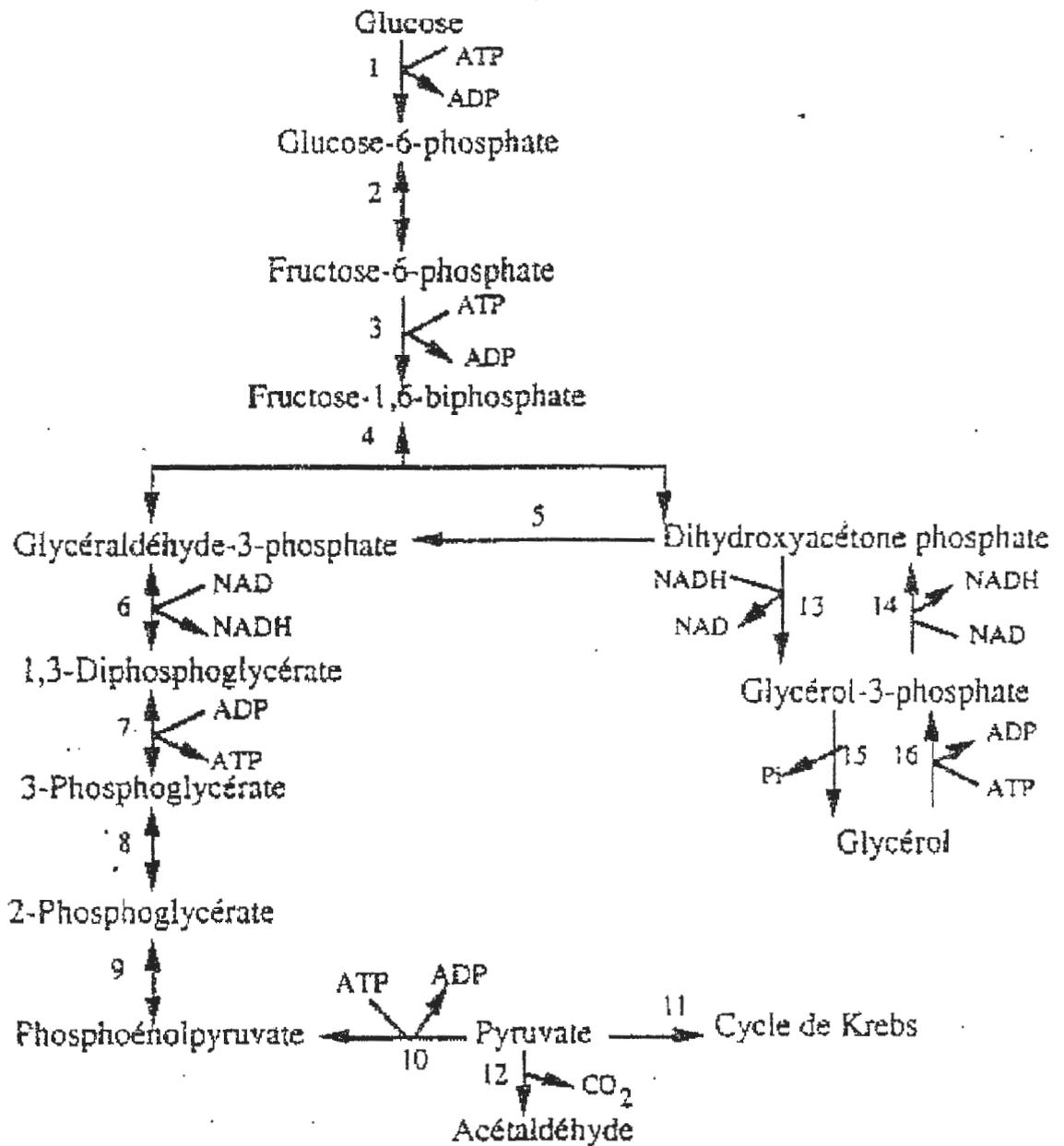


Figure 05 : La Voie de la Glycolyse (EMP). (9)

Les enzymes indiquées par les chiffres sont les suivantes : 1 : hexokinase, 2 : phosphoglucose isomérase, 3 : phosphofruktokinase, 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

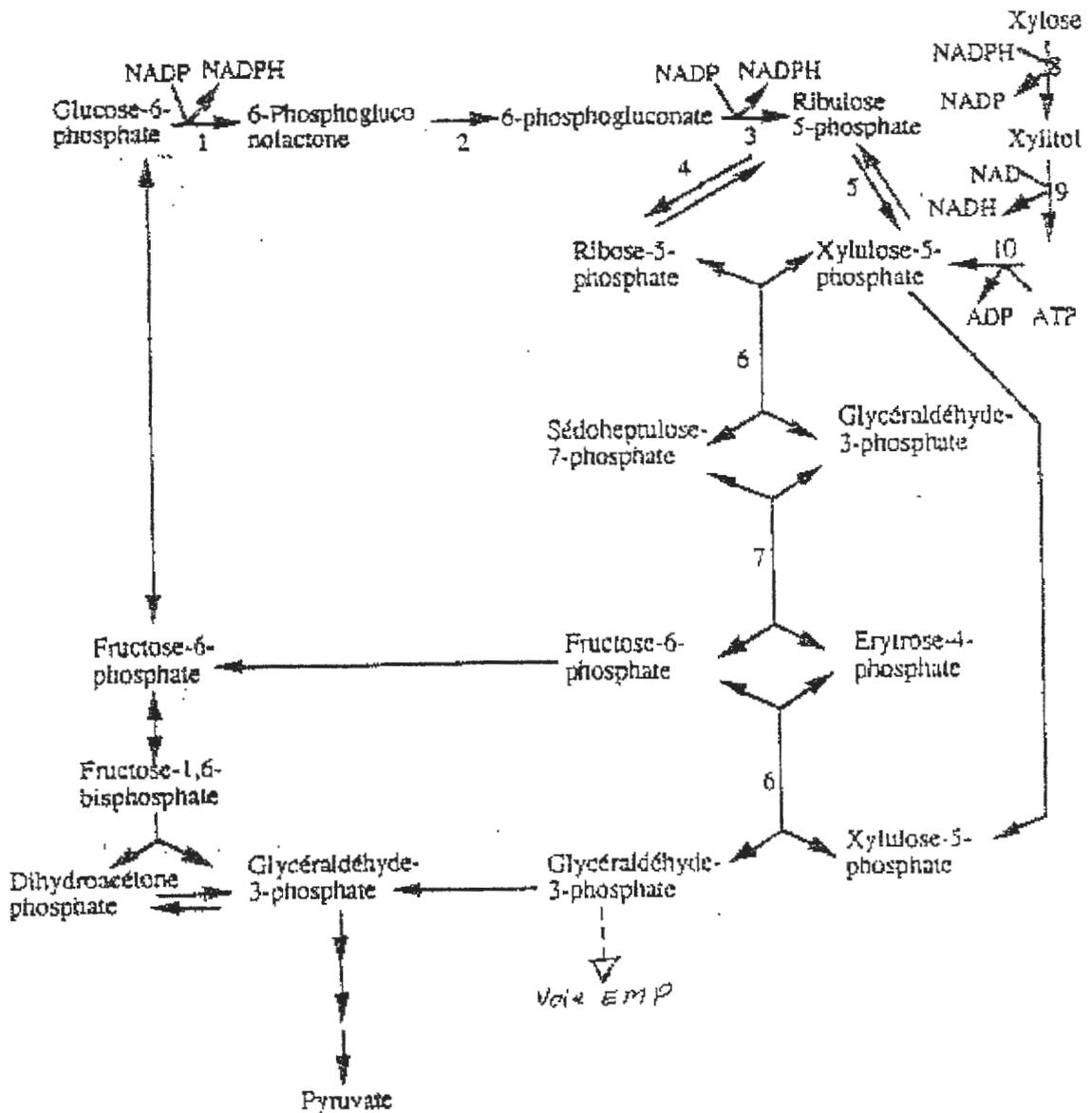


Figure 06 : La voie de Hexoses Mono-Phosphate. [24]

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

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

CHAPITRE III

Déchets Industriels
Utilisés 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, récupère 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. [35], [36]

III-1-2. Mélasses 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 les domaines scientifiques, parvient par des procédés complexes à synthétiser les cristaux de sucre translucides à partir du jus. Il est utilisé pour la fabrication d'alcool, d'éthanol et nourriture pour les animaux [37]

III-1-3. Mélasses de Betterave:

Le sucre naturel de la betterave et la canne s'appelle Saccharose ou (sucrose) et est constituée 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%. [37]

III-2. Milieux Naturels à Base de Déchet de Dattes:

La datte étant une des matières premières utilisées dans la présente étude, la présentation générale de ses aspects botaniques et morphologiques du fruit s'avère nécessaire. Les procédés technologiques sont ainsi ajustés en fonction de ces données. [5]

Le patrimoine phoenicicole Algérien, estimé aujourd'hui à plus de 10 millions de palmiers, se caractérise par une grande diversité dans les variétés cultivées. Les palmeraies principales commencent sur le versant sud de l'atlas saharien, par les palmeraies de Deglet-nour de BISKRA et Tolga à l'Est, celles du M'Zab au centre de Beni-Ounif à l'extrême sud-ouest du sahara. Les tableaux II, III nous montrent respectivement la taxonomie et les principaux cultivars.

Tableau II : cultivars dominants les principaux pays producteurs de dattes [25]

Pays	Cultivars	Pays	Cultivars
Maroc	Jihel, boufeggous, mehjouf	Mauritanie	Ahmar, tinterguel, tidiguert, amseri, sekani
Algérie	Rhars, Megla-beida, Mech-degla, Deglet-nour	Irak	Zahidi, sayir, hallaoui, Hadraoui
Tunisie	Deglet-nour, Ftimi ou Allig	Iran	Savir, mouzafti, kabkab, mordasang, chahani
Libye	Bikraari, khadrai, tASFert	Pakistan	Jowansor, berni, karochsiah
Egypte	Hayani, Saidi ou Siwi, Samani	Bahreïn	mizouba
Soudan	Barakaoui, Goundleïla, Bint Hamouda, Michrig oued-Laggaï, Michrig oued-Khatib	Tchad	Martchiano
Arabie saoudite	Rouziez, Koulass, Kounneizi	Mascate	Hamrouya
Hadramaout	Hamrauya		

Tableau III : Stade d'évolution et Appellation [25]

Pays	I	II	III	IV	V
Sahara algérien	Loulou	Kh'lal	Bser	Mretba ou Mertouba	Tmar
Libye (zone côtière)	-	Gamag	Bissir	Routab	Tmar
Irak	Hababouk	Kimri	Kalal	Routab	Tmar
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Enguei	Blah	Tmar

III-2-1. Compositions Chimiques

La chair de la datte mûre est composée de sucres, d'eau, de cellulose, d'éléments minéraux et de produits divers : protides, lipides, pectines, tanins, vitamines, produits aromatiques etc....

Les sucres et l'eau sont les constituants les plus importants et ces deux éléments confèrent, par leur proportion, la consistance de la chair. [25]

Tableau IV : Composition de la pulpe de datte sèche, en % du poids frais [25]

N° de l'échantillon	1	2	3	4
Eau	19	17,5	20,2	17,5
Protéines	02	2,5	1,85	2,5
glucides	73	69	65,20	69,5
Fibres alimentaires	8,7	7,1	9,2	7,1
Lipides	0,5	0,5	0,53	0,5
Cendres	/	/	1,82	/

III-2-1-1. Humidité

La teneur en eau des dattes évolue en fonctions du stade de maturité. L'humidité décroît des stades verts aux stades mûrs. [4]

III-2-1-2. Sucres

Les sucres sont considérés comme les composants majeurs des dattes. De nombreuses analyses faites par différents auteurs et dans différents pays ont montré que la datte contient trois sucres. Le saccharose, le fructose et le glucose, ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres qu'il faudra rechercher. [4]

III-2-1-3. Protéines et Lipides

Les lipides sont concentrés dans l'épicarpe (2,5-7,5%) et joue un important rôle physiologie de protection du fruit. Ils contribuent de 0,1 à 0,4 % à la valeur nutritionnelle de la pulpe de datte. Ces lipides sont constitués essentiellement des acides gras libres palmitiques, caprique et caprylique. [4]

Les protéines se trouvent dans la datte à un pourcentage variant de 1 à 3 % et renferment de nombreux acides aminés essentiels mais en trop faibles quantités. [4]

III-2-1-4. Tanins

Presque toutes les dattes sont astringentes au stade **Kimri** en raison de la présence d'une couche de tanins au-dessous de la peau. [11]

III-2-1-5. Fibre Brutes

Ces composées généralement insolubles sont constituées essentiellement de cellulose, Hemicellulose, Lignine, Lignocellose, et de complexe protéique insoluble durant le processus de maturation et deviennent soluble sous l'action des enzymes de maturité. [4]

III-2-1-6. Substances Pectiques

Les substances pectiques (Protopectine, Pectine Soluble,...etc.) sont indésirables pour les fabricant de sirop de dattes, leur présence rendant le filtrage difficile. [11]

III-2-1-7. Amidon

La présence d'amidon dans les dattes n'existe qu'au moment de la pollinisation et jamais plus tard. [3]

III-2-1-8. Vitamines et Minéraux

Les constituants minéraux ont été étudiés par plusieurs auteurs, les cendres représentent approximativement 2% du poids à l'état frais des dattes mûres. [3] La datte n'est pas considérée comme une grande source de vitamines. [3]

III-2-1-9. Enzymes

Les enzymes jouent un rôle important dans le processus de transformation au cours de la maturation de la datte.

- a) **Invertase** : Responsable de l'inversion du saccharose en glucose, en fructose.
- b) **Polygalacturonase et Pectinestérase** : Transforment les substances pectiques.
- c) **Cellulase** : Transforme la cellulose en composés de courtes chaînes.
- d) **Polyphenol Oxydase** : Agit sur les polyphénols qui constituent les tanins. [4]

III-2-1-10. Autre Composés

Bien que 95% des constituants de la datte sont représentés par les composés cités. Il existe d'autres composés moins importants mais qui influent sur la qualité du fruit. Comme par exemple : acides organiques (l'acide citrique, malique et oxalique), ont été isolés de la pulpe de datte, ces acides contribuant à l'amélioration du goût du fruit. [4]

ETUDE EXPERIMENTALE



CHAPITRE IV

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE IV

Materiels et Méthodes

IV-1. Matériels nécessaires

- Dattes (GHARS) ;
- Flacons de 250ml ;
- Fioles de 500ml ;
- Pipette Pasteur ;
- Entonnoir ;
- Papier filtre WATMAN ;
- Autoclave ;
- lame de comptage (de type Thoma) ;
- Microscope optique ;
- Bain-marie ;
- lame et lamelle ;
- Eau distillée ;
- Four de stérilisation ;
- Agitateur réglé ;
- Spectrophotomètre (SECOMAM) S.250 ;
- Réfrigérateur ;
- PH mètre ;
- Balance de précision ;
- Des béchers.
- Mortier

Micro-organisme utilisé : La souche utilisée pour ce travail est une souche de levure *saccharomyces cerevisiae* (levure de boulangerie).

IV-2. Etapes de travail

IV-2-1. Traitement du GHARS

Après avoir le ghars on enlève le noyau et puis en partage en 03 échantillants de 150g pour chacun, on mélange chaque échantillant avec 200ml de l'eau distillée dans un fiole.

Chacun de ces échantillants subit un traitement différent l'un de l'autre :

Premier Milieu : on applique un traitement thermique ; le milieu est porté dans un bain mari à une température de 100 °C pendant 30 minutes après on

effectue une filtration du mélange sur papier WATMAN, on obtient alors l'extrait de Ghars.

Deuxième Milieu : on fait un broyage du milieu pendant 20 minutes le mélange obtenue subit une filtration comme précédemment on obtient l'extrait du Ghars, on le garde à la température ambiante.

Troisième Milieu : Le milieu est agité pendant 30 minutes, on filtre le mélange obtenue, on le met dans un réfrigérateur à une température de 4 °C pendant 24 h (Traitement au froid).

Pour assurer un apport en azote, on ajoute aux trois milieux la composition suivante :

1g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

6g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

IV-2-2 Préparation des Milieux Synthétiques

On prépare 3 milieux synthétique, utilisés pour évaluer la croissance de la population de levures, ces milieux sont différents en quantité du Glucose.

- Le premier Milieu contient :
 - 5 g/l du Glucose
 - 1 g/l de Phosphate **Diammonique** $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 - 6 g/l de Sulfate **d'ammonium** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Le deuxième Milieu contient :
 - 10 g/l du Glucose
 - 1 g/l de Phosphate **Diammonique** $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 - 6 g/l de Sulfate **d'ammonium** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- Le troisième milieu contient :
 - 20 g/l du Glucose
 - 1 g/l de Phosphate **Diammonique** $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
 - 6 g/l de Sulfate **d'ammonium** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

IV-2-3. Etalonnage de l'Appareil

L'estimation de la biomasse s'effectue avec un spectrophotomètre par lecture de la densité optique (D.O) à une longueur d'onde de 660nm.

Un étalonnage préalable du spectre permet d'établir une corrélation entre la densité microbienne et la densité optique.

Les échantillons sont dilués de façon à obtenir des D.O dans la zone linéaire du spectrophotomètre utilisé afin d'obtenir cette corrélation nous avons le protocole suivant :

- 1) Faire une suspension de levures.
- 2) faire une série de dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) à partir de la suspension (solution mère).
- 3) Mesurer l'absorbance de chacune des dilutions avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660nm.

Dénombrement des cellules :

Chaque dilution qu'on a mesuré sa densité optique précédemment subit un examen microscopique, on va compter directement le nombre des cellules correspondant, pour cela nous allons utiliser la technique directe de numération avec une lame de comptage (cellule de type THOMA).

On met une goutte de dilution sur la lame recouverte par la lamelle, on observe en microscope optique à un grossissement X 40 et on compte les cellules dans chaque carré.

Le volume de chaque carré est $\frac{1}{4 \cdot 10^6}$ ml, soit n_i le nombre des cellules

comptées dans p carrés ($p=100$), on calcul la moyenne :

$$n = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_p}{p}$$

Le nombre de cellules/ml de la suspension est en suite déterminé par $N = n \cdot 4 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Les résultats obtenus sera représenté graphiquement sur une courbe selon la fonction suivante : $DO = f(\text{nombre de cellules})$, cette dernière représente la courbe d'étalonnage de l'appareil.

IV-2-4. Le Suivi de Croissance

Après l'autoclavage des milieux préparés (les 3 milieux de datte, et les 3 milieux synthétiques), on prépare 6 béchers dans lesquels on met la même quantité de chaque milieu, après on verse 1 ml de la suspension de levure dans chaque bécher.

Les levures vont alors consommer les substrats contenant dans les différents milieux, et se multiplier, on évalue à chaque une heure la population de levures dans chaque milieu, cette évaluation s'effectue par la mesure de la densité optique de chaque milieu grâce au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 660 nm. Il faut d'abord agiter les milieux à l'aide d'un agitateur magnétique durant toute l'expérience. On peut donc déterminer le nombre de cellules contenues dans chaque bécher à partir de la courbe étalon, car il y a une relation de proportionnalité direct entre l'absorbance et le nombre de cellules.

IV-2-5. Détermination du PH

Il est indispensable de contrôler le pH du milieu, car les levures sont des microorganismes acidophiles donc le pH est mesuré à chaque lecture de l'absorbance à l'aide d'une électrode de pH mètre. Ce paramètre peut être un facteur limitant pour la croissance quand t-il a une grande variation

CHAPITRE V

Résultats & Discussion

CHAPITRE V

Résultats et Discussion

V-1. Etalonnage du Spectrophotomètre

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

Les valeurs de la concentration en biomasse seront déduites de la courbe étalon, représentée par :

$$D.O=f([\text{cellules}]) \text{ (voire figure N° 07)}$$

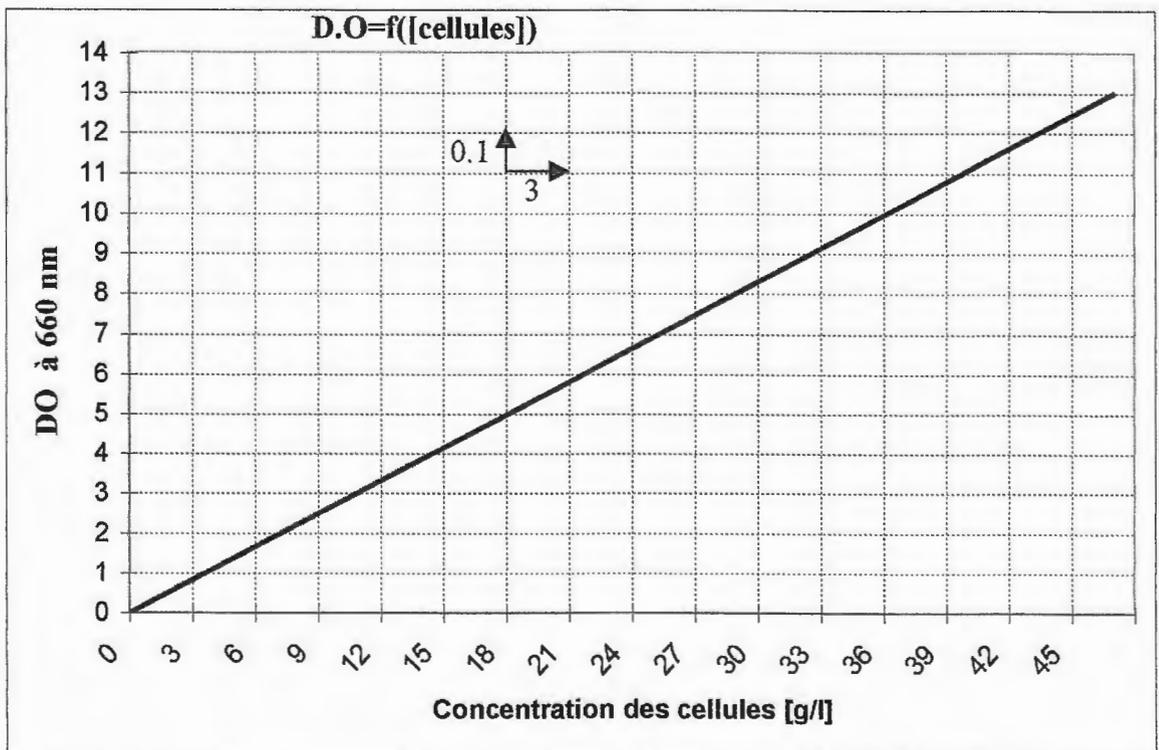


Figure 07 : Courbe d'étalonnage

V-2. Evolution de la Croissance sur Milieux Naturels et Synthétiques

a) Milieu Naturel

Les résultats de croissance de la levure sont représentés par les courbes de la figure N° 08.

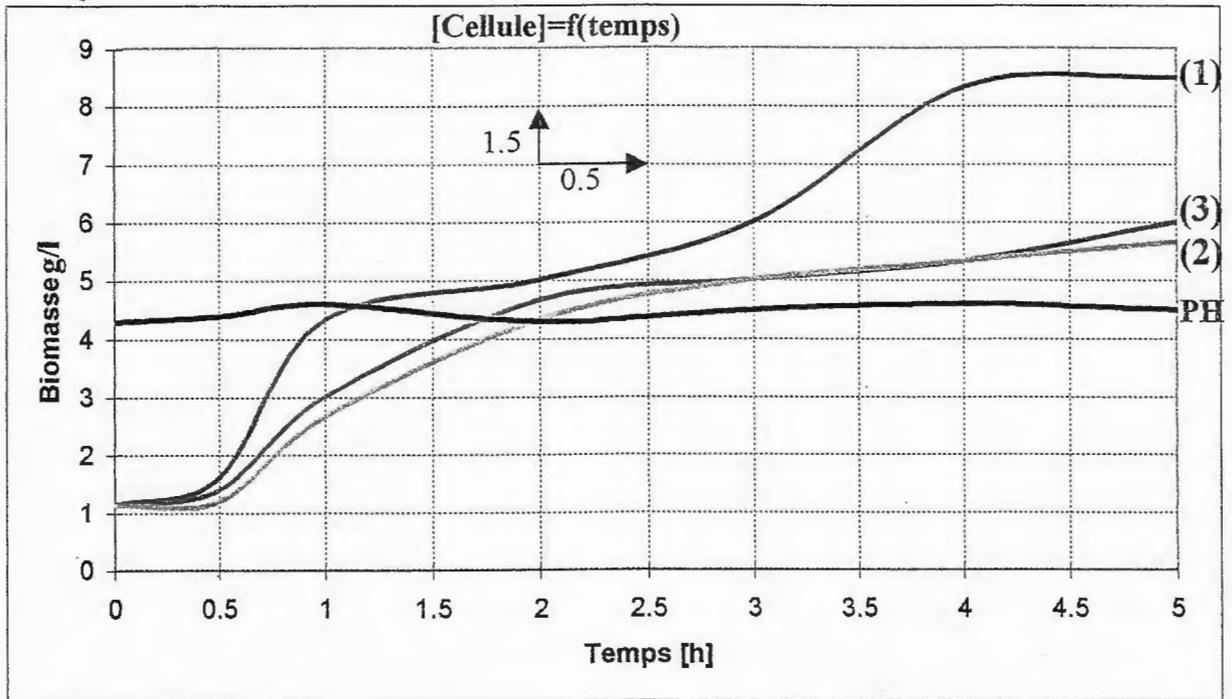


Figure 08 : Evolution de la Cinétique Croissance de la levure sur les 3 milieux naturels

- Courbe (1) : Croissance sur le milieu traité à chaud
- Courbe (2) : Croissance sur le milieu broyé
- Courbe (3) : Croissance sur le milieu traité à froid

b) Milieu Synthétique

Les résultats du suivi de croissance sont représentés par les courbes de la figure N° 09.

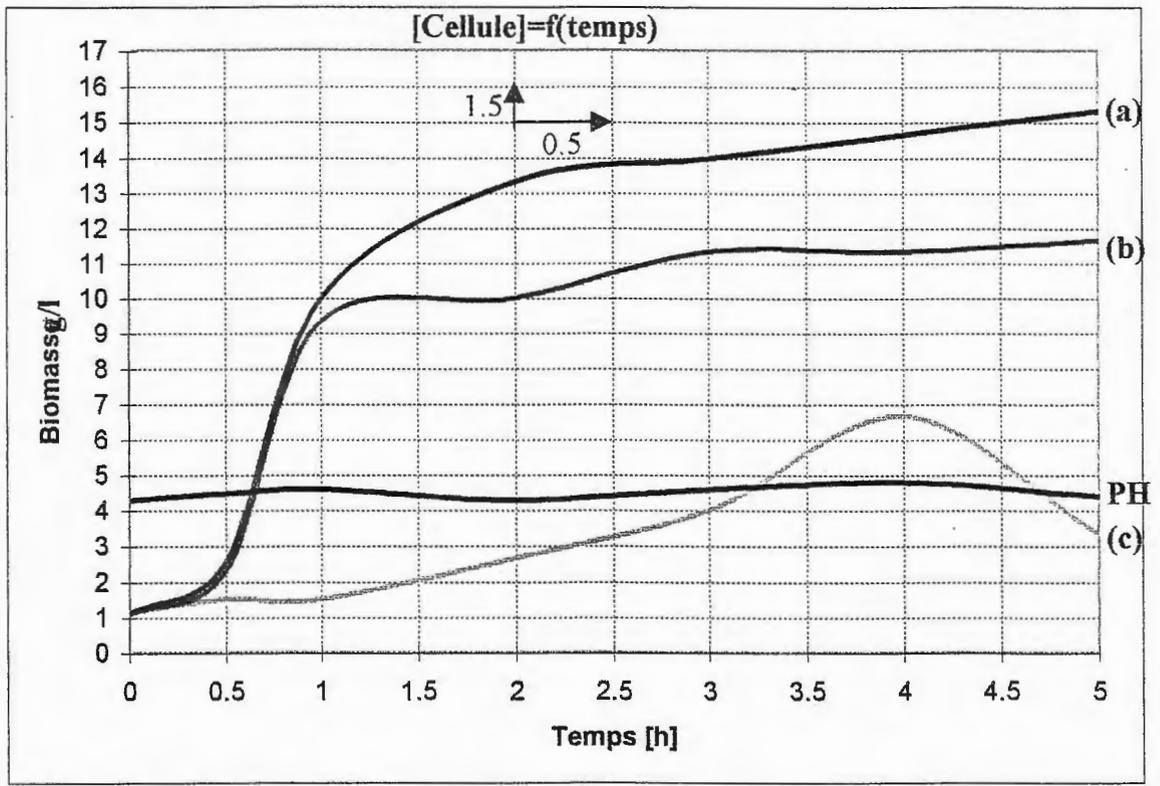


Figure 9 : Evolution de la Cinétique de Croissance de Levure sur les 3 Milieux Synthétiques

- Courbe (a) : Croissance sur le milieu contenant 20 g/l du glucose
- Courbe (b) : Croissance sur le milieu contenant 10 g/l du glucose
- Courbe (c) : Croissance sur le milieu contenant 5 g/l du glucose

c) Comparaison des deux Résultats sur Milieu Naturel et Synthétique

Nous avons choisi la courbe qui présente un bon rendement en biomasse dans les deux milieux.

Ces deux courbes sont représentés sur un même repère (voire figure N° 10)

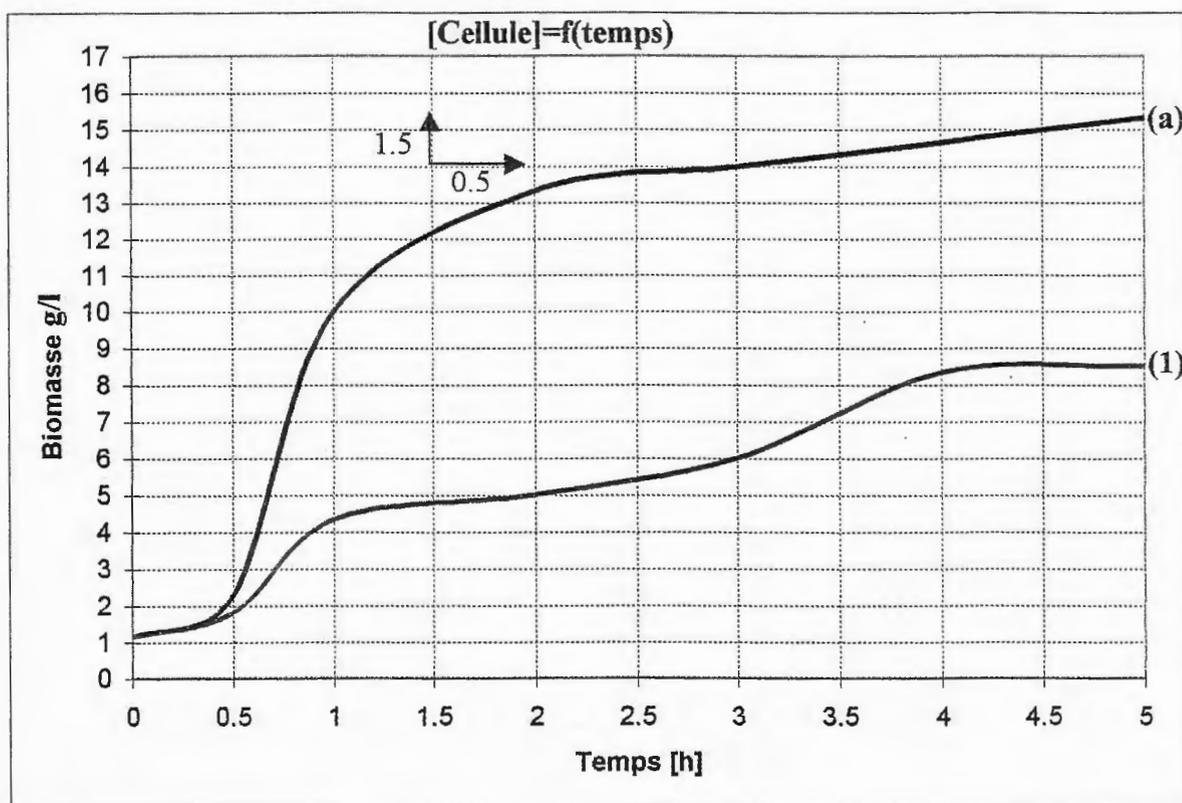


Figure 10 : Comparaison des Résultats

- Courbe (1) : Croissance sur le milieu traité à chaud
- Courbe (a) : Croissance sur le milieu contenant 20 g/l du glucose

Discussion

La comparaison des résultats obtenus de la croissance cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en BATCH, sur milieu synthétique, à base de glucose (5, 10, 20 g/l) et naturel à base de Ghars traité de trois manières différentes (Chaud, Froid, Broyage), nous permet de déduire ce qui suit :

- Milieu Synthétique : la courbe de la concentration 20 g/l de glucose (figure N° 09) présente un temps de latence très faible et une phase de croissance exponentielle très importante, dans le cas des courbes de faible concentrations en glucose 5 g/l et 10 g/l, on peut dire que le métabolisme cellulaire est orienté vers les voies respiratoires à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne terminale de transport d'électrons est donc le rendement en biomasse est faible.
- Milieu Naturel : on remarque que la courbe qui présente une bonne allure par rapport aux autres est celle obtenue avec le milieu à base de Ghars traité par la chaleur (Bain Marie) (figure N° 08), la densité optique augmente au fur et à mesure du temps, la phase de latence est faible, la phase exponentielle est importante avec un rendement en biomasse considérable. La courbe du PH garde la même allure durant tous les essais.

La comparaison des deux courbes choisies (sur lien synthétique et milieu naturel) (figure N° 10), nous permet de mettre en évidence la différence de rendement en biomasse à titre indicatif après 3^h30^{mn} de croissance pour le milieu naturel on a un rendement de 11 g/l, alors que pour le milieu synthétique on a presque le double 21.5 g/l, ceci peut s'expliquer par le fait que le premier milieu contient des glucides non assimilable directement alors que le second contient du glucose (glucide facilement assimilable par le microorganisme).

Conclusion

L'objectif scientifique principal de notre travail est de mettre au point à l'échelle de laboratoire une cinétique de fermentation de la levure du type *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu naturel à base de Ghars, qui est produit en abondance en Algérie. Au cours de cette étude nous avons montré que le rendement en biomasse est satisfaisant sur le milieu naturel traité à chaud en comparaison au milieu synthétique contenant 20g/l de glucose comme source de carbone donc on peut déduire que le traitement par la chaleur du milieu naturel Ghars nous permet de dissoudre le maximum de glucides contenu dans les fibres constituant la pulpe du fruit. Ce qui donne un extrait très riche en sucre (source de carbone pour la croissance du microorganisme). Mais l'utilisation rationnelle du Ghars comme substrat peut faire l'objet de nombreuses perspectives à savoir :

- Réaliser des essais complémentaires en cultures continue en faisant tester le taux de dilution sur le rendement en biomasse de la levure.

- Faire des analyses complémentaires concernant l'éthanol et les autres métabolites secondaires tel que l'acétaldéhyde et l'acétate.
- Elaborer un model physiologique caractérisant le comportement des levure sur le milieu à base de Ghars en continu et discontinu.
- Définir un protocole expérimental pour réaliser un essai sur fermenteur pilote de 1000 litres.

En fin, il s'agit bien d'un essai qui n'a nullement la prétention d'avoir cerner tous les problèmes qui constituant les préoccupations essentielles de notre étude. Nous espérons avoir apporté une contribution qui ne soit pas sans intérêt.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLIET.J,(1997) ;Cytobiologie. Ellipses. Edition marketing SA
- [2] AICHA.D.N,(1997) ;Transformation et Valorisation des Sous Produits de Dattes en Biomasse à Partir de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Magister. Université de Constantine.
- [3] ASHMAWI.H, HUSSEIN.A.A, AREF.H,(1955) ;Chemical Changes Samani Dates During Growth and Ripening, Faculty of Agriculture. Cairo University.
- [4] BARREVELD.W.H,(1993) ;Datte palm Products FAO, Bulletin101,Rome(page275).
- [5] BELGUED.J.M,(1996) ; Caractéristique des Cultivars de Dattiers du Sud-Est de Sahara Algérien INRA et ITDAS.voll.
- [6] BIORON.P,(1996) ;Organisation et Biologie des Champignons.
- [7] BONALY.R,(1991) ;Ultra-Structure des Levures en Biotechnologie des Levures.
- [8] BOOIJ et AL,(1993) ;Sugar and free Aminoacid ; Composition of Five Cultivars of Dates from Offshoots or Vitro Plants in Open Field. j. Agric. Food.
- [9] BOTTON.B, (1991) ; La Physiologie des Levures en Biotechnologie des Levures.
- [10] DAVID.J.C, (1996) ; Biochimie Métabolique. Paris.
- [11] DAWSON.V.H.W et ATEN.A,(1963) ;Récolte et Conditionnement des Dattes. Collection FAO. Cahier N°72.
- [13] DJIDEL-NACIB.A,(1997) ; Transformation de sous Produits de Dattes en Biomasse à partir de *Saccharomyces cerevisiae* .Thèse de Magister.
- [14] DUTEURTRE et M.MOLL, (1991) ; Les Levures et les Boissons Alcoolisées en Biotechnologie des Levures.
- [15] GALZY.P et GUIRAND.J,(1980) ;L'analyse Microbiologique dans les Industries Alimentaires. Les Editions de l'Usine.
- [16] HASLAY.C et LECLERC.H,(1993) ;Microbiologie des Eaux d'Alimentation. Lavoisier.
- [17] JOSEPH GUIRAND et PIERRE GALZY,(1980) ;L'analyse Microbiologique dans les Industries Alimentaires. Edition de l'Usine.
- [18] LAMRI.T,(1991) ;Contribution à l'Etude des Levures Metylotropes. Mémoire d'Ingénieur d'Etat .U. de Setif.
- [19] LARPEND.J.P, (1991) ;Biotechnologie des Levures.
- [20] LARPEND.J.P et LARPEND.G,(1997) ; Mémentotechnique de Microbiologie.3^{eme} Edition.

- [21] LECLERC.H, GAILLARD.J.L et SIMONET.M,(1995) ;Microbiologie Générale. Doin Editeur. Paris.
- [24] MOAT.A.G et FOSTEZR.J.W,(1988) ;Carbohydate Métabolisme and Energy Production in Microbial Physiology.
- [25] MUNIER.P,(1973) ; Botanique en le Palmier Dattier. Vilardebo.
- [26] PATRICK.B,(1996) ;Organisation et Biologie des Champignons.
- [28] POL.D,(1996) ; Travaux Pratique de Biologie des Levures Ellipses Edition Marketing SA.
- [30] RENAUD.J,(1963) ; Biologie de Levures en Biologie de Vin.
- [31] SCRIBAN.R, ARNAUD.A, LEVEAU.J, GALZY.P et THOMAS.D, (1993) ; Biotechnologie 4^{ème} Edition, Londres, New-York, Lavoisier Paris.
- [32] SIMON.P et MEUNIER.R,(1970) ; Microbiologie Industrielle et Génie Biochimique Edition Massom.
- [34] YAICI.R et GHZGHOUZ.Y, (1990) ; Contribution à l'Amélioration des Conditions de Conservation de la Souche *Saccharomyces cerevisiae*, Mémoire d'Ingénieur d'Etat.
- [35] <http://saveur.sympatico.ca/ency-8/sucre/mélasse.htm>
- [36] www.hello-caribbeau.com
- [37] www.globetrotter.net

ANNEXE

Annexe(01) :Résultats de l'étalonnage

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
DO(à 660nm)	1.3	1.25	0.73	0.65	0.23
Concentration des cellules(g/l)	47.32	40.5	26.5	22.1	8.2

Annexe(02) :Résultats de la cénitique de croissance sur trois milieux naturels

Temps	0	1h	2h	3h	4h	5h
Milieu broyé	1.8g/l	4g/l	7g/l	7.5g/l	8g/l	8.5g/l
Milieu traité à froid	1.8g/l	4.5g/l	6.5g/l	7.5g/l	8g/l	9g/l
Milieu traité à chaud	1.8g/l	6.5g/l	7.5g/l	10g/l	12.5g/l	12.5g/l

Annexe(03) :Résultats de la cénitique de croissance sur trois milieux synthétiques

Temps	0	1h	2h	3h	4h	5h
Milieu contenant 5g/l du Glucose	1.8g/l	3g/l	4g/l	6g/l	10g/l	5g/l
Milieu contenant 10g/l du Glucose	1.8g/l	14g/l	15g/l	17g/l	17g/l	17.5g/l
Milieu contenant 20g/l du Glucose	1.8g/l	15g/l	20g/l	21g/l	22g/l	23g/l

Résumé

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un microorganisme qui a une grande importance dans le domaine scientifique et alimentaire, actuellement divers substrat sont utilisé pour la production de ce microorganisme, notre étude vise la mise en évidence du rendement d'un substrat a base d'un produit qui est le Ghars produit en grande quantité en Algérie. Les résultats sont satisfaisants en comparaison avec un milieu synthétique à base de glucose, reste à déterminer la rentabilité économique de l'utilisation de ce substrat.

Summary

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a micro-organism which has a great importance in the scientific and food field, currently various substrate are used for the production of this micro-organism, our study aims at the description of the output of a substrate has base of a product which is Ghars produced in great quantity in Algeria. The results are satisfactory in comparison with a synthetic medium containing glucose, remains to determine the economic profitability of the utilization of this substrate.

ملخص

خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* من الكائنات المجهرية التي تملك أهمية كبيرة في المجال العلمي و كذلك في مجال التغذية، حاليا مواد مختلفة تستعمل في إنتاج هذا الكائن المجهرى. دراستنا التجريبية هذه بينت مدى نمو الخميرة على وسط يحتوى أساسا على مادة الغرس و بالتالي إمكانية إنتاجها على هذه الأخيرة التي تنتج بكميات كبيرة في الجزائر. النتائج المتحصل عليها تعتبر كافية مقارنة مع وسط مصنع يحتوى على كمية معتبرة من الجلوكوز. يبقى تقدير و تحديد مردودية استعمال هذه المادة من الناحية الاقتصادية.

Mots Clés

Saccharomyces cerevisiae, Fermentation, Respiration, Croissance, Biomasse, Ghars, Glucose.