

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la recherche Scientifique



Université EL HADJ LAKHDAR - Batna -
Faculté des Sciences
Département d'Agronomie



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de **MAGISTER**
Sciences Agronomiques

Spécialité : TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

Option: Qualité et Sécurité Alimentaire

THEME

PRODUCTION ET ETUDE DE L'ACTIVITE DE
L'INVERTASE PRODUITE PAR LA LEVURE

Saccharomyces cerevisiae

SUR SUBSTRAT A BASE DE DATTE

Réalisé et soutenu par :

Mr BACHA ALI

Devant la commission d'examen :

M^r. FAHLOUL D.

Mme ALLOUI LOMBARKIA O.

Mr. Mr BAGHIANI A.

Mr LAROUI S.

Maître de conférence université de Batna

Professeur Université de Batna

Maître de conférence université de Setif

Maître de conférence université de Batna

Président

Rapporteur

Examineur

Examineur

Année universitaire 2007/2008

R é s u m é

La production des dattes occupe un rang important dans l'agriculture Algérienne, une partie de celle-ci reste non commercialisée (rebut).

Afin de trouver un débouché plus rémunérateur, nous avons jugé utile de valoriser les dattes à faible valeur marchande, par des transformations afin d'obtenir des produits nouveaux facilement commerciales et d'un grand intérêt industriel.

A cet effet, nous avons essayé d'isoler une souche de levure « *Saccharomyces cerevisiae* » à partir d'extrait de dattes variété « Mech- Degla ».

Les résultats nous ont révélés:

- une bonne adaptation de la souche isolée dès le début de la culture au milieu qui est son milieu naturel, contrairement à la souche commerciale qui a présenté une faible adaptation au départ. Cependant les deux souches ont présenté le même taux de croissance qui est de l'ordre de $0.16 \text{ (h}^{-1}\text{)}$.
- une activité élevée de l'invertase due à la richesse des dattes variété Mech- Degla en saccharose ($0,65\text{g/min}$).

A la lumière de ce travail nous avons constaté que l'utilisation de cette nouvelle biotechnologie permet d'une part d'éviter la dépendance vis-à-vis l'étranger concernant l'importation de l'enzyme et d'autres part stimuler la valorisation des produits dérivés des dattes.

Mots-clés : datte, levure, fermentation, invertase, β -fructofurannosidase, *Saccharomyces cerevisiae*

المخلص

إنتاج التمور يحتل نسبة كبيرة من الإنتاج الزراعي الجزائري ، كمية معتبرة من الثروة تبقى غير مسوقة ، لذلك رأينا أنه يجب إعادة التقييم بنحويل هذا النوع من التمور إلى مواد جديدة سهلة الاستعمال و ذات أهمية صناعية . من مستخلص التمور (ماش دقلة) التي تنتج (*Saccharomyces cerevisiae*) لهذا الغرض حاولنا في هذا العمل عزل خميرة الخبز انزيم الانفرتاز .

تبين لنا هذه الدراسة :

- التأقلم الجيد للخميرة المعزولة من البداية في وسطها الطبيعي ، على عكس الخميرة التجارية التي سجلت تأقلم بطيء ، بينما سرعة النمو المسجلة بالنسبة للخميرتين هي نفسها حيث قدرت بـ $0.16 \text{ (h}^{-1}\text{)}$
 - ارتفاع نشاط الأنفرتاز ناتج عن غنى التمور من نوع "ماش دقلة" بالسكاروز (0.65g/ع)
- بعد هذه الدراسة استنتجنا أن استعمال هذه البيوتكنولوجيا الجديدة يساعد على تقليص التبعية الأجنبية من جهة و من جهة أخرى محاولة توسيع استغلال التمور و مشتقاتها .

S U M M A R Y

Dates production occupies an important place in the Algerian agriculture. A part of this production is not sold .

In order to use all that quantity of dates we have judged it possible to make them useful through some transformations in order to obtain new product that would be easy to put at market and of a great industrial use.

We have tried to isolate a stock from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) starting from extract of the dates variety (Mech-degla) that it product the enzyme invertase.

The results have revealed to us:

- a good adaptation of the isolated kind since the beginning of culture , in it 's natural setting ,on the contrary of the commercial kind witch presented a weak adaptation in the beginning .The growth rate recorded of the stock insulated and the commercial stock is about $0.16 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ witch are cultivated under the same operating conditions .
- a high activity of invertase due from the richness of the dates variety Mech-Degla with sucrose (0.65g/min)

In the light of this work we noted that the use of this new biotechnology makes it possible on the one hand to avoid the dependence opposite the strange foreigners ones and on the other hand to stimulate the valorization of the products derived from dates .

☞ REMERCIEMENTS ☞

Je tiens à remercier vivement mon promoteur Mme ALLOUI-LOMBARKIA O. pour avoir accepté d'encadrer et diriger ce travail, et pour m'avoir permis de bénéficier de ses conseils tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie également :

Mr FAHLOUL D. pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider mon jury de soutenance.

Mr LAROUI S. pour m'avoir honoré et accepté d'examiner mon travail.

Mr BAGHIANI A. pour sa disponibilité en acceptant de juger ce modeste travail.

En fin, je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin.

☞ ALI ☞

Table des matières

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Introduction

Etude bibliographique

Introduction

Chapitre 1:

Données sur les dattes

1. Définition de la datte	2
2. Généralités sur le palmier dattier	2
3. Répartition géographique du palmier dattier	3
4. Les variétés de dates	4
5. Production des dattes	4
6. Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe"	6
7. Caractéristiques de la variété « Mech-Degla ».....	9
8. Valeur nutritionnelle de la datte	10
9. Produits élaborés à base des dattes	11

Chapitre 2:

Données sur les levures

1. Généralités	14
2. caractéristiques des levures	15
3. Données sur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.1. Définition	18
3.2. Morphologie	18
3.3. Reproduction	19
3.4. Principes d'identification de la levure	20
3.5. Caractéristiques biochimiques	20
3.6. Condition de culture de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.7. Besoins nutritionnels	21
3.8. Principales applications de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22

Chapitre 3:

Techniques d'isolement des levures et étude des aptitudes Technologiques

1- Techniques d'isolement des levures	23
1.1. Isolement différentiel de levures	23
1.2. Techniques d'identification des levures	24
1.2.1. Caractères culturels	24
1.2.2. Caractères morphologiques	25
1.2.3. Caractères biochimiques et physiologiques	27
2- Moyens d'étude des aptitudes technologiques d'une levure boulangère	28
2.1. Cinétique de croissance en « Batch »	28
2.2. Taux de croissance	28
2.3. Temps de génération	28
2.4. Rendement pondéral	28
3. Données sur la fermentation et la production de la biomasse	29
3.1. Définition	29

Table des matières

3.2. Modalités de conduite de la fermentation	29
3.3. Optimisation de la fermentation	30
3.4. Quelques usages industrielles des types de fermentation	31
3.5. Production de biomasse	32
3.5.1. Mécanisme de la formation de la biomasse	32
3.5.2. Application de la production de biomasse	32
3.5.3. Optimisation de la production de la biomasse	32
Chapitre 4:	
Données sur l'invertase	
1. Généralité sur les enzymes	33
1.1. Définition	33
1.2. Cinétique de la réaction enzymatique	34
1.3. Vitesse de la réaction enzymatique	34
1.4. Classification des enzymes	35
1.5. Rôle des enzymes en technologie alimentaire	35
1.6. Application des enzymes en agroalimentaire	35
2. Préparation industrielle des enzymes	36
2.1. Enzyme d'origine microbienne	37
2.2. Définition de l'enzyme recherchée	37
2.3. Sélection de la souche microbienne	37
2.4. Production d'enzyme par fermentation	38
3. Données sur l'invertase	39
3.1. Historique	39
3.2. Définition de l'invertase.....	39
3.3. Production de l'invertase par fermentation	39
3.4. Extraction	40
3.5. Séchage	40
3.6. La bioconversion	42
3.7. Intérêt de l'invertase	43
Chapitre 5:	
Matériel et Méthode	
1. Matériel végétal	45
1.1. Description et choix de la variété	45
1.2. Méthodes d'analyses	46
1.2.1. Détermination de la teneur en eau	46
1.2.2. Préparation de l'extrait de datte	46
1.2.3. Détermination du pH	47
1.2.4. Dosage des sucres	47
1.2.4.1. Dosage des sucres totaux	47
1.2.4.2. Dosage des sucres réducteurs	48
1.2.4.3. Teneur en saccharose	49
1.2.5. Détermination de la teneur en protéines Méthode de Kjeldhal	49
1.2.6. Détermination de la teneur en cendres	50
1.2.7. Analyse des éléments minéraux (K, Na et P)	50

Table des matières

2. Matériel biologique	52
2.1. Choix de la souche	52
2.2. Isolement et identification	52
2.2.1. Préparation de l'extrait de date d'isolement	52
2.2.2. Caractéristiques culturelles	53
2.2.3. Caractéristiques morphologiques de la cellule végétative	54
2.2.4. Caractéristiques physiologiques	54
2.3. Aptitudes à la fermentation (croissance) en Batch	56
2.3.1. Entretien de la souche de levure	56
2.3.2. Préparation de l'inoculum	57
2.3.3. Ensemencement du fermenteur	57
2.3.4. Moyen d'étude de la croissance de la souche de levure	59
3. Etude de l'activité enzymatique de la biomasse (l'invertase)	60
3.1. Etude de l'activité enzymatique dans une solution de saccharose à 50% ...	60
3.2. Inversion de l'extrait de date variété sèche "Mech-Degla"	61
3.2.1. Analyse quantitative des sucres du sirop après inversion	61
3.2.2. Analyse qualitative des sucres par Chromatographie sur couche mince (CCM)	61

Chapitre 6 :

Résultats et discussions

1. Compositions biochimiques de la date variété sèche : « Mech-Degla»	63
1.1. Teneur en eau	64
1.2. Le pH	64
1.3. Teneur en sucres	64
1.3.1. Teneur en sucres totaux	64
1.3.2. Teneur en sucres réducteurs	64
1.3.3. Teneur en Saccharose	64
1.4. Teneur en protéines totales (azote Kjeldahl) :	65
1.5. Teneur en cendres totales	65
1.6. Teneur en éléments minéraux	65
2. Isolement et identification de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
2.1. La fermentation alcoolique de l'extrait de dattes	66
2.2. Caractéristiques culturelles	66
2.3. Caractéristiques morphologiques	67
2.4. Caractéristiques physiologiques	68
2.4.1. fermentation des sucres	68
2.4.2. Assimilation des substrats azotés	68
2.5. Aptitudes à la fermentation	70
3. Etude de l'activité de l'invertase	72
3.1. Etude de l'activité enzymatique dans une solution de saccharose à 50%	72
3.2. Etude de l'activité enzymatique dans l'extrait de date sèche "Mech-Degla"	74
3.2.1. Analyse quantitative des sucres de l'extrait après inversion	74
3.2.2. Analyse qualitative des sucres par chromatographie sur couche mince	75

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe

Liste des Tableaux

Tableau N°01 : Répartition géographique et nombre de palmiers dattiers en Algérie	3
Tableau N° 02 : Les catégories de dattes selon leur consistance.	4
Tableau N° 03 : Production de dattes par pays, en 2003	5
Tableau N°04 : Teneur en eau de quelques variétés de dattes Algériennes en (%).	6
Tableau N°05 : Composition en sucres de quelques dattes Algériennes.	7
Tableau N°06 : Composition en acides aminés de la datte.	7
Tableau N°07 : Composition de la pulpe de datte en sels minéraux.	8
Tableau N°08 : Composition vitaminique de la pulpe de datte.	8
Tableau N°09 : Caractéristiques de la variété «Mech-Degla».	9
Tableau N°10 : Composition (g/100) et valeur énergétique des variétés sèches (Iran).	10
Tableau N° 11 : Teneur en éléments minéraux dans la pulpe, en mg / 100g de matière sèche	10
Tableau N°12 : Composition moyenne d'une levure sèche.	16
Tableau N°13 : Production industrielle de la levure alimentaire sur divers substrats	17
Tableau N°14 : Classification de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	18
Tableau N°15 : Caractéristiques biochimiques de <i>S. cerevisiae</i> .	20
Tableau N°16 : Les principales applications de <i>S. cerevisiae</i>	22
Tableau N°17 : Les principales usages industriels de la fermentation.	31
Tableau N°18 : Classification des enzymes basée sur le type de réaction chimique catalysée.	35
Tableau N°19 : Quelques applications des enzymes produites par fermentation.	36
Tableau N°20 : Les principales origines des enzymes.	37
Tableau N°21 : La gamme étalon pour le dosage des sucres totaux	47
Tableau N°22 : Répartition des extraits d'isolement	53
Tableau N°23 : Composition biochimique de la datte variété sèche « Mech-Degla »	63
Tableau N°24 : Teneurs en éléments minéraux de la datte sèche : « Mech-Degla ».	65
Tableau N°25 : Test de fermentation des sucres de la souche isolée comparé à la souche de référence (commerciale)	68
Tableau N°26 : Test d'assimilation des substrats azotés	68
Tableau N°27 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps pour la souche " <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " isolée (SI) et la souche commerciale (SC)	70
Tableau N°28 : Suivi de l'activité enzymatique de la biomasse dans une solution de saccharose à 50 %	72
Tableau N° 29 : Inversion du saccharose dans l'extrait de datte par la biomasse (en % des sucres totaux).	74
Tableau N°30 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des sucres de datte sèche avant et après l'inversion par l'invertase	75

Liste des figures

Figure N°01 : Le palmier dattier variété "Mech-Degla"	2
Figure N°02 : Répartition du palmier dattier en Algérie	3
Figure N°03 : Variété Mech-Degla au cours de maturation	4
Figure N°04 : Aspect morphologique de Mech-Degla	9
Figure N°05 : Transformations des dattes	11
Figure N°06 : Aspect morphologique d'une levure	15
Figure N°07 : Représentation idéalisée d'une cellule de levure	15
Figure N°08 : Micrographie de <i>S. cerevisiae</i>	18
Figure N°09 : Cycle biologique de la levure <i>S. cerevisiae</i>	19
Figure N°10 : Système classique d'identification	20
Figure N°11 : Caractères culturels en milieu solide(Sabouraud)	24
Figure N°12 : Mode de reproduction végétative	25
Figure N°13 : Représentation schématique d'une fermentation en mode « Fed-Batch » ...	29
Figure N°14 : Les composants d'une holoenzyme (enzyme entière)	33
Figure N°15 : Schéma de l'étude expérimentale	44
Figure N°16 : Datté Mech-Degla	45
Figure N° 17 : Extraits de dattes d'isolement	53
Figure N°18 : Fermenteur de paille à contrôle automatique type H.W.S	57
Figure N°19 : Variété sèche : « Mech-Degla » utilisée	63
Figure N°20 : Extrait de datté variété sèche : « Mech-Degla » utilisée	63
Figure N°21 : Aspect culturels de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en milieu de base	66
Figure N°22 : Aspect culturels de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur milieu Sabouraud	66
Figure N°23 : Aspect culturels de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sur milieu WLN	67
Figure N°24 : Test de filamentation	67
Figure N°25 : Test des caractéristiques physiologiques	69
Figure N°26 : La biomasse de " <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " isolée	70
Figure N°27 : Courbe de croissance de la levure " <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " Souches isolée et commerciale	70
Figure N°28 : Taux de croissance des deux souches de levure (isolée et commerciale)...	71
Figure N°29 : Suivi de l'activité enzymatique de la biomasse (invertase) dans la première heure	72
Figure N°30 : Suivi de l'activité enzymatique de la biomasse (invertase) en fonction du temps.....	73
Figure N°31 : Quantité de sucres invertis sous l'action de l'invertase dans l'extrait de datté variété "Mech-Degla"	74
Figure N°32 : Chromatographie des sucres de la datté sèche avant et après inversion ...	75

INTRODUCTION

Selon les dernières statistiques la production de dattes est évaluée à plus de 5 millions de quintaux pour l'année 2004-2005. Cette importante production rencontre des difficultés dues à l'absence d'une industrie de transformation et d'une faible commercialisation des variétés autre que Deglet-Nour (**Saouli, 2005**). Les dattes de faibles valeurs marchandes représentent 30 à 50 % de la production algérienne (**FAO, 2003**).

La transformation des dattes de faible valeur marchande permet l'élaboration de différents produits alimentaires tel que: les farines de dattes, le sirop de dattes et le jus de dattes (**Touzi, 2005**).

La valorisation de ces dattes par les procédés biotechnologiques permet la production de biomasse et de différents métabolites. Cette production de biomasse constitue la base de nombreuses activités industrielles : production de levain, production de levures diététique et surtout production de protéines d'origine unicellulaire (POU).

Les dattes à faible valeur commerciale peuvent être utilisées comme substrats carbonés par les espèces microbiennes (levures, bactéries,...etc) afin de produire la biomasse. Les levures sont les premiers micro-organismes à avoir été observés au microscope par Antoine Van Leeuwenhoek qui les a dessinées vers 1680. Elles constituent une source précieuse de protéines car elles sont le siège d'une biosynthèse protéique très active.

Un grand nombre de substances que nous utilisons chaque jour résultent de l'exploitation des micro-organismes dont l'origine remonte à la plus haute antiquité, mais il a fallu attendre les découvertes de Pasteur pour pouvoir s'établir les connaissances scientifiques précises qui ont permis la naissance d'une industrie des fermentations débordant le cadre traditionnel (pain, boissons fermentées...etc).

Les levures constituent également une source importante de synthèse de diverses enzymes utilisées dans l'industrie. L'invertase est l'une de ces enzymes, elle est sécrétée par diverses levures et utilisée industriellement pour produire du glucose et du fructose invertis. (**Didier, 1996; Haq et al., 2002**). Ces sucres sont employés en agro-alimentaires (confiseries, biscuiteries, ... etc.), ils sont préférés au saccharose parce que ils sont doux et ne cristallisent pas. En Algérie cette enzyme est importée en totalité.

Le but de notre travail consiste à:

- Isoler et identifier la souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui produit mieux de l'invertase, à partir d'un milieu à base d'extrait de dattes variété sèche " Mech-Degla ";
- Produire la biomasse de la levure *Saccharomyces cerevisiae*;
- Etudier l'activité de l'invertase produite.

Chapitre 1: *Données sur les dattes*

1. Définition de la datte

La datte, fruit comestible sucré du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. (Espiard, 2002)

- Une partie comestible représentée par la chair ou pulpe dont la forme, la consistance, la couleur à maturité sont variables selon les variétés.

- Une partie non comestible, formée par la graine ou le noyau ayant une consistance dure, variables selon les variétés. (Dowsen et Aten, 1963)

Les dattes sont généralement de forme allongée, oblongue ou ovoïde, mais on rencontre également des dattes sphériques. (Peyront, 2000)



Figure N°01: Le palmier dattier "Mech-Degla"

2. Généralités sur le palmier dattier

Le palmier dattier : *Phoenix dactylifera L.*, provient du mot □*Phoenix* □ qui signifie dattier chez les phéniciens, et *dactylifera* dérive du terme grec □*dactulos* □ signifiant doigt, allusion faite à la forme du fruit (Djerbi, 1994).

Le dattier est un arbre probablement originaire du golfe persique, cultivé dans les régions chaudes et humides. C'est une espèce dioïque, monocotylédone arborescente, appartenant à une grande famille d'arbres à palmes et produit des dattes (Gilles, 2000; Mazoyer, 2002).

Le palmier dattier est cultivé comme arbre fruitier dans les régions chaudes arides et semi-arides. Cet arbre peut s'adapter à de nombreuses conditions grâce à sa grande variabilité (Gilles, 2000).

Le dattier est une espèce thermophile ; il exige un climat chaud, sec et ensoleillé. C'est un arbre qui s'adapte à tous les sols. Il est sensible à l'humidité pendant la période de pollinisation et au cours de la maturation (Munier, 1973; Toutain, 1979).

3. Répartition géographique du palmier dattier

* En Algérie

Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de **120 830** hectares. Cependant, quatre principales wilayas représentent 83,6 % du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23 %, Adrar 22 %, El-Oued 21 % et Ouargla 15 %.

Tableau N°01 : Répartition géographique et nombre de palmiers dattiers en Algérie (I.T.D.A.S, 2001).

Wilaya	Superficie occupée (ha)	Deglet-Nour (Dattes fines).	Ghars et analogue (Dattes molles).	Degla –Beida et analogues (Dattes sèches).	Total Palmiers Dattiers	
					Total	En rapport
Al – Oued	27395	1808140	681000	284860	2774000	2140000
Biskra	24894	1319190	430710	783460	2533360	1998580
Adrar	19625	0	0	2704780	2704780	1997650
Ouargla	16811	967580	846450	120170	1934200	1585770
Autres	15665	315640	257520	1516150	2089310	1343610
Total	104390	4410550	221568	5409420	12035650	9065610

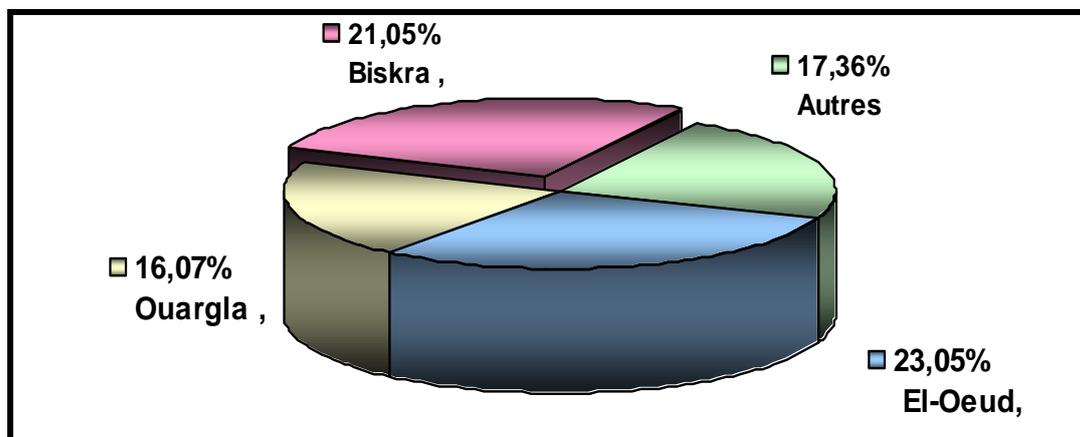


Figure N°02 : Répartition du palmier dattier en Algérie (I.T.D.A.S, 2001).

* Dans le monde

Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient.

L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (**Toutain, 1996**).

Au Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fût introduit au 18^{ème} siècle. Sa culture n'a débutée réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (**Matallah, 2004**).

4. Les variétés de dattes:

La répartition des variétés de datte est selon leur consistance qui peut être dure ou molle dont lesquelles on distingue quatre catégories qui sont présentées dans le **Tableau N°2**.

Tableau N° 02 : Les catégories de dattes selon leur consistance.
(Peyron, 2000)

CONSISTANCE	CATEGORIE
Molle	Molle Demi-molle
Dure	Demi-sèche Sèche

Les variétés de dattes sont très nombreuses, seulement quelques unes ont une importance commerciale. Elles se différencient par la saveur, la consistance, la forme, la couleur, le poids et les dimensions (**Djerbi, 1994; Belguedj, 2002**).

En Algérie, il existe plus de 940 cultivars de dattes (**Hannachi et al., 1998**). Les principales variétés cultivées sont :

- **La Deglet-Nour** : Variété commerciale par excellence. C'est une datte demi-molle, considérée comme étant la meilleure variété de datte du fait de son aspect, son onctuosité et sa saveur. A maturité la datte est d'une couleur brune ambrée avec un épicarpe lisse légèrement plissé et brillant, le mésocarpe présente une texture fine légèrement fibreuse.
- **Les variétés communes** : Ces variétés sont de moindre importance économique par rapport à Deglet-Nour. Les variétés les plus répandues sont : Ghars, Degla-Beïda et Mech-Degla. Une grande proportion des variétés communes est de consistance molle (**Belguedj, 2002**).

5. Production des dattes

La production mondiale de dattes, qui oscille autour de sept millions de tonnes par année, a doublé depuis les années 1980. C'est le cinquième fruit en importance des régions arides et semi-arides, après les agrumes, la mangue, la banane et l'ananas, et le premier parmi les fruits séchés, avant les raisins, les figes et les pruneaux. On en produit dans 34 pays, les plus importants étant l'Égypte, l'Iran, l'Arabie saoudite, les Émirats arabes, l'Irak, le Pakistan et l'Algérie.

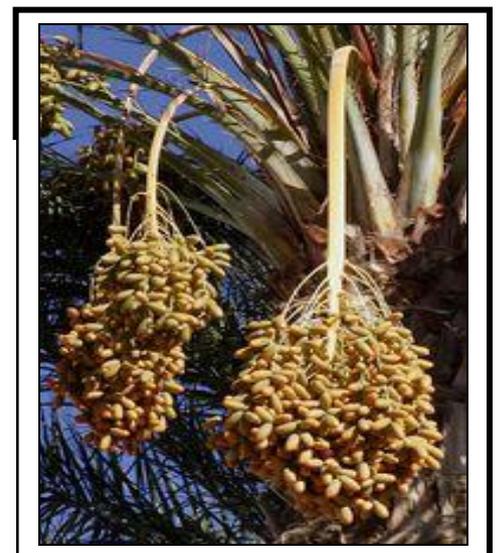


Figure N°03: Variété Mech-Degla au cours de maturation

**Tableau N° 03 : Production de dattes par pays, en 2003
(F A O, 2003)**

Pays	Production, en tonnes
Egypte	1 100 000
Irak	910 000
Iran	880 000
Arabie-Saoudite	830 000
Emirats Arabes Unis	760 000
Pakistan	650 000
Algérie	450 000
Soudan	330 000
Oman	238 611
Libye	140 000
Tunisie	110 000
Maroc	54 000
Yémen	33 000
Mauritanie	24 000
Tchad	18 000
U.S.A	18 000

Du point de vue quantitatif, la production algérienne représente 7 % de la production mondiale, mais du point de vue qualitatif, elle occupe le premier rang grâce à la variété Deglet-Nour, la plus appréciée mondialement.

Les dattes sèches de faible valeur marchande offrent des avantages technologiques qui doivent être exploités par l'industrie.

D'après les statistiques du Ministère de l'Agriculture , la production nationale a atteint 492.000 tonnes en 2003 dont 30 à 40% sont constitués de déchets de dattes de qualité commerciale médiocre, soit environ 140.000 tonnes qui pourraient être valorisées (**Touzi, 2005**)

A l'horizon l'an 2010, il est attendu une production dattière d'environ 1 million de tonnes. Cependant la commercialisation de cette production en l'état, risque de rencontrer de nombreuses contraintes au niveau national qu'au niveau international. (**Saouli, 2005**)

6. Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe"

La chair représente 80 à 95% du poids de la datte fraîche, elle est riche en sucre, ce qui lui donne un très grand pouvoir énergétique (Maatalah, 1970).

Elle est également riche en eau, en éléments minéraux et en substances vitaminiques, par contre sa teneur en matière grasse est faible (Benattia, 1990).

Les sucres et l'eau sont les constituants les plus importants et ces deux éléments confèrent par leur proportion la consistance de la chair (pulpe) (Munier, 1973).

- L'eau :

La teneur en eau de datte est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Les limites de cette valeur varient de 5 à 31% du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19%. (Dowsen et Aten, 1963)

Tableau N°04 : Teneur en eau de quelques variétés de dattes Algériennes en (%).
(Munier, 1973)

Variétés	Humidité
Dattes molles : GHARS	30
Dattes sèches : DEGLA BAIDA	10.7
MECH -DEGLA	17.7
Dattes demi-molles DEGLET NOUR	25.2

- Les sucres :

Les études faites sur les fractions glucidiques montrent que la datte contient essentiellement trois types de sucres : le saccharose, le fructose et le glucose. Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres tels que : le xylose, l'arabinose et le galactose, mais ils sont en quantité négligeable, environ 1.6% de la pulpe fraîche. (Ourlis, 2002). Le glucose et le fructose sont des sucres réducteurs (sucres invertis) qui proviennent de l'hydrolyse du saccharose. (Dowsen et Aten, 1963).

La teneur en sucre varie en fonction du climat et du stade de maturation de la datte, elle varie aussi selon les variétés et leur consistance dont les limites de 50 à 85% de la pulpe fraîche pour les sucres totaux avec des proportions qui peuvent atteindre jusqu' à 60% du poids de la pulpe fraîche en saccharose (dattes molles) et 17 à 85% pour les sucres réducteurs. (Maatalah, 1970; Acourene et Tma, 1997)

De façon générale, les dattes molles sont caractérisées par une teneur élevée en sucres réducteurs (glucose, fructose), et les dattes sèches par une teneur élevée en saccharose.

**Tableau N°05 : Composition en sucres de quelques dattes Algériennes.
(Belguedj, 2002)**

Variétés		Pourcentage par rapport à la matière sèche		
Consistance	Appellation	Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose
Molle	Ghars	85.28	80.68	04.37
Demi-molle	Deglet noir	71.37	22.81	46.11
Sèche	Degla baida	71.00	42.00	30.36

La forte teneur en sucres de la pulpe de datte confère à ces fruits une grande valeur énergétique, pour 100g de pulpe (Munier, 1973) : 306 calories pour Deglet noir et 260 calories pour les dattes communes.

- Les protéines :

La datte est particulièrement pauvre en protéines qu'on rencontre essentiellement dans le noyau. Elles varient de 0.38 à 2.5% du poids frais, malgré leurs faibles quantités, les protéines sont assez équilibrées qualitativement. (RAZI, 1993)

**Tableau N°06 : Composition en acides aminés de la datte.
(Darkaoui, 1985)**

ACIDES AMINES	TENEUR DE LA PULPE EN mg/100g
Acide aspartique	341
Acide glutamique	422
Serine	141
Glycine	296
Thréonine	105
Alanine	121
Lysine	170
Arginine	163
Valine	196
Leucine et isoleucine	267
Tyrosine	172
Tryptophane	102

- Les lipides :

Les matières grasses se trouvent dans la datte en quantité moyenne de 1.25% du poids frais (Maatalah, 1970).

- Les éléments minéraux :

La pulpe de datte est riche en éléments minéraux et constitue de ce fait un aliment intéressant. Les dattes peuvent être considérées comme les fruits les plus riches en éléments minéraux. (Munier, 1973)

Tableau N°07 : Composition de la pulpe de datte en sels minéraux.
(Foura, 1980)

Sels minéraux	Teneur en mg/100g
Sodium	27-70
Potassium	600-1600
Calcium	20-150
Magnésium	32-170
Phosphore	34-120
Cuivre	02-19
Fer	15-08
Zinc	0.25-01
Manganèse	0.5-01

Les éléments minéraux les plus importants de la pulpe de datte sont : le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le sodium.

- Les vitamines :

La pulpe de datte contient des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leurs provenances. En général, elle contient des vitamines de groupe B en quantité appréciable mais pas de vitamine C, ou à une quantité négligeable. (Munier, 1973)

Tableau N° 08 : Composition vitaminique de la pulpe de datte.
(Munier, 1973)

Vitamine	Teneur en mg/100g de pulpe
Thiamine (B ₁)	0.06-0.13
Riboflavin (B ₂)	0.05-0.17
Acide Pantathénique(B)	0.24-0.3
Niacine	0.9-2.2
Vitamine E	trace
Acide Ascorbique (C)	05

- Autres constituants :

La datte contient de nombreux autres constituants :

***Cellulose :** Les dattes fines, comme la Deglt-Nour ne contiennent qu'une faible proportion de cette substance, mais certaines dattes communes particulièrement fibreuses en contiennent plus de 10% du poids frais (Maatalah, 1970).

***Substances aromatiques :** D'une façon générale, les dattes sont peu aromatiques, et leur arôme, plus ou moins prononcé, semble dû à des esters ou à des groupes d'esters. (Munier, 1973)

7. Caractéristiques de la variété « Mech-Dega »

Les caractéristiques de MECH-DEGLA sont :

- **Caractéristiques du cultivar Figure N°3**

Nom vernaculaire : Mech-Degla

Sens du nom : qui ne ressemble pas à la Deglet- Nour.

Importance et répartition : abondant.

Date de maturation: Octobre. Figure N°4

Date de récolte: Octobre- Novembre.

Utilisation de la datte: fraîche et conservée.

Mode de conservation: en sacs ou régime.

Appréciation: datte excellente

Digestibilité: datte froide, très digestible.

Commercialisation: très importante, surtout dans le nord du pays. (Belguedj, 2002)



Figure N°04: l'aspect morphologique de Mech-Degla

- **Caractéristiques morphologiques du fruit (Figure N°4)**

- La plus populaire des dattes sèches pour ses qualités gustatives et facilité de conservation.

- La datte est de forme sub-cylindrique, légèrement rétrécie à son extrémité : Elle est de taille moyenne: 3,5 / 1,8 cm et d'un poids de 6,5g.

- A maturité ; la datte est plutôt beige claire teintée d'un marron peu prononcé.

- L'épicarpe est ridé, peu brillant et cassant, la pulpe est blanche à texture farineuse avec de légers reflets quartziques. Le calice se décolle facilement, voûté et de couleur jaune paille.

- Le tégument est fin et transparent.

- **Caractéristiques chimiques :**

Tableau №.9: Caractéristiques de la variété «Mech-Degla». (Noui., 2007 ; Chibane et al., 2007)

<i>Poids de la datte en g</i>	<i>Poids de la pulpe en g</i>	<i>Teneur en eau (%)</i>	pH	Protéines (%) MF	Lipides (%) MF	Pectine (%) MF	Sucres totaux (%) MF	Cendre (%) MF
6,10	5,10	14,71	6,14	0,18	0,25	0,18	63,8	2

8. Valeur nutritionnelle de la datte :

Les dattes constituent un excellent aliment que les caravanes utilisent dans le désert souvent presque exclusivement pendant de longs temps; leur richesse nutritive est renforcée par une certaine quantité de vitamines «A», et de vitamine «B». (**Lecoq, 1965**).

Le taux élevé des sucres permet de classer la datte parmi les aliments glucidiques ce qui a permis de constituer un aliment de grande valeur nutritive et énergétique. Les matières sucrées peuvent atteindre 70% du poids du fruits et ne descendent jamais en dessous de 50% ce concentré de sucre permet aux datte d'être utilisées dans les cas de grandes fatigues physiques (**Toutain, 1977**).

Tableau N°10: Composition (g/100) et valeur énergétique des variétés sèches (Iran).
(**Al-Farsi et al, 2006**)

Composants %	Fard	Khasab	Khalas
Eau	18,5	16,5	12,6
Protéines	1,47	1,61	1,68
Lipides	1,41	0,98	0,52
Cendres totales	1,49	1,59	1,79
Sucres totaux	77,13	79,32	83,41
Energie	278	281	301

La datte est caractérisée par:

- Une forte teneur en glucide, dû à sa richesse en sucres réducteurs (**Maatallah, 1970**).
- Un pouvoir énergétique élevé : 200 à 300 Kcalories/100 g du fruit (**Munier,1973**).
- Protéines équilibrées qualitativement mais en faible quantité. (**Tabib, 1999**)
- Elle est riche en éléments minéraux plastiques: Ca, S, Mg, Pet en éléments minéraux catalytiques: Fe, Mn. (**Noui, 2007**)

Tableau N° 11 : Teneur en éléments minéraux dans la pulpe, en mg / 100g de matière sèche.
(**Chibane et al, 2007**)

Elément	Mech-Degla	Degla-Beida	Freeza
K	678	575	610
Ca	231,75	286,22	249,49
Mg	21,34	2,55	1,80
Na	34	12,25	15,77
Zn	1,27	2,02	1,82
Fe	0,99	2,74	2,84
Cu	0,13	0,122	0,19
Mn	0,05	0,34	0,20

9. Produits élaborés à base des dattes.

Aujourd'hui, par des procédés biotechnologiques simples, il est possible d'élaborer une nouvelle génération de produits (figure N°5)

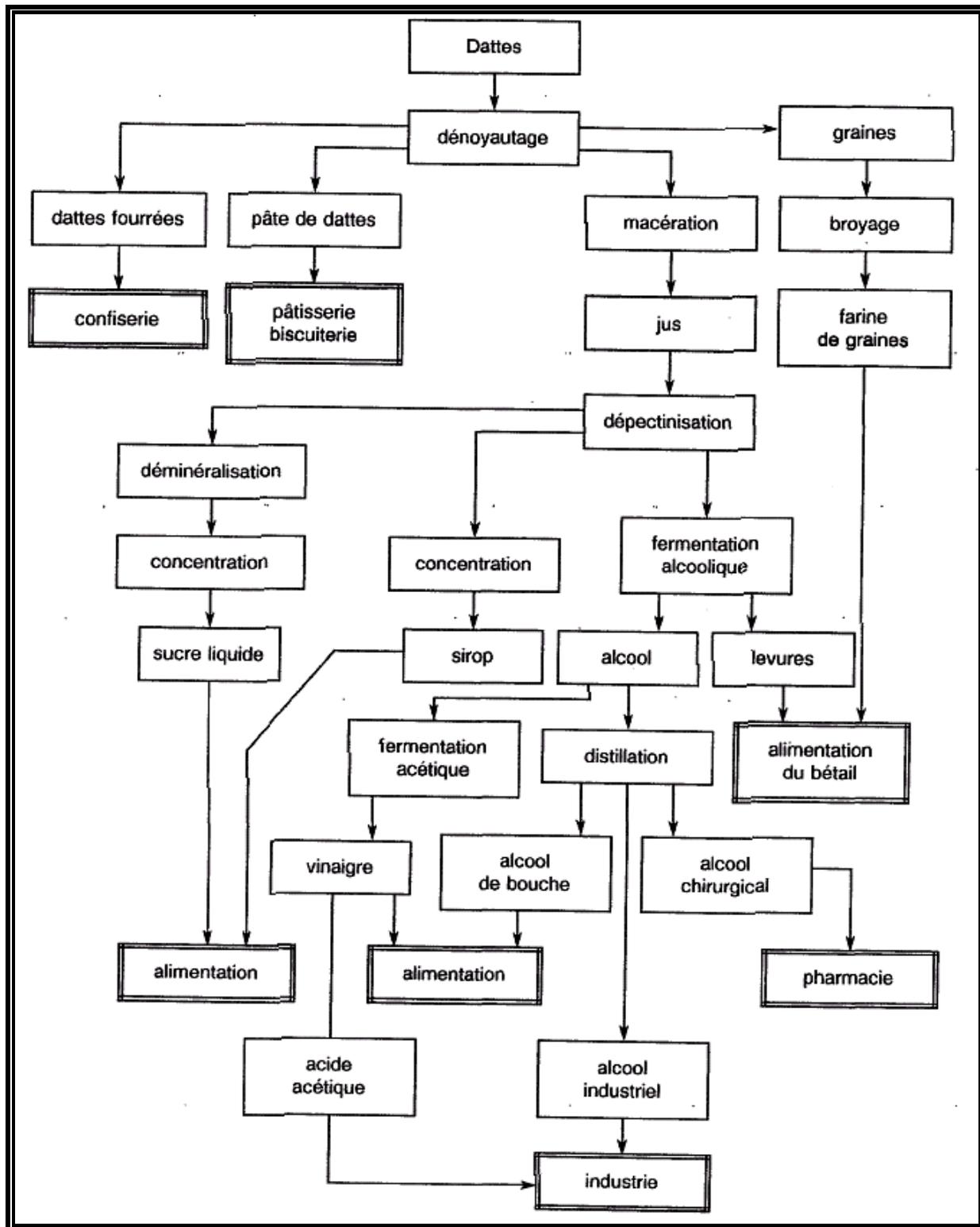


Figure N°5: opération de transformation des dattes (Estanove, 1990)

La technologie de la datte recouvre toutes les opérations qui, de la récolte à la consommation, ont pour objet de préserver toutes les qualités des fruits et de transformer ceux qui ne sont pas consommés, ou consommables à l'état, en divers produits, bruts ou finis, destinés à la consommation humaine ou animale et à l'industrie (**Estanove, 1990**).

- Conditionnement de la datte

L'industrie de conditionnement joue un rôle primordial dans la préservation, l'amélioration de la qualité et l'augmentation de la valeur marchande des fruits, surtout celles qui sont destinées à l'exportation.

Le conditionnement des dattes, concerne l'ensemble des opérations effectuées après la cueillette et destinées à présenter un produit fini prêt à être consommé. Ces opérations sont : la désinsectisation, le triage et le lavage éventuel, l'humidification et / ou le séchage, l'enrobage éventuel par le sirop, la mise en caisse ou en boîte et l'entreposage frigorifique (**Abdelfateh, 1988**).

Les conditionnements sont très personnalisés dans chaque entreprise et selon la clientèle destinataire (**Espiard, 2002**).

- Transformation de la datte

Pâte de datte

Les dattes molles ou ramollies par humidification donnent lieu à la production de pâte de datte. La fabrication est faite mécaniquement. Lorsque le produit est trop humide il est possible d'ajouter la pulpe de noix de coco ou la farine d'amande douce. La pâte de datte est utilisée en biscuiterie et en pâtisserie (**Espiard, 2002**).

Farine de datte

Elle est préparée à partir de dattes sèches ou susceptibles de le devenir après dessiccation. Riche en sucre, cette farine est utilisée en biscuiterie, pâtisserie, aliments pour enfants (**Kendri, 1999; Aït-Ameur, 2001**) et yaourt (**Benamara et al, 2004**).

Sirop, crèmes et confitures de dattes

Ces produits sont également fabriqués à base de dattes saines car il est important d'éviter tout arrière goût de fermentation.

Selon **Espiard (2002)**, cette gamme de produit est basée sur l'extraction des sucres par diffusion de ces derniers et des autres composants solubles de la datte. Par mélange et cuisson de pâte ou de morceaux de dattes et de sirop nous pouvons obtenir des crèmes ou des confitures d'excellente qualité.

- Mise en valeur des rebuts

Les dattes abîmées et de faible valeur marchande peuvent être utilisées en raison de leur forte teneur en sucre pour la production de :

Biomasse et protéines d'origine unicellulaires

La production de protéines reste un objet essentiel afin de subvenir aux besoins mondiaux. A cet égard des essais de production de protéines d'organismes unicellulaires par culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu à base de dattes ont été réalisés. Selon **Kendri. (1999)** l'analyse des biomasses produites montre leur richesse en protéines à raison de 32 à 40 % de poids sec.

Alcool

Les dattes constituent un substrat de choix pour la production de l'alcool éthylique. Selon, l'alcool éthylique a été produit au laboratoire avec un rendement de 87 % (**Ould el hadj et al., 2001**)

Vinaigre

Les dattes peuvent être utilisées pour l'élaboration du vinaigre (). Ce dernier a été produit par culture de la levure *Saccharomyces uvarum* sur un extrait de datte (**Boughnou, 1988; Ould El Hadj et al, 2001 ; Benamara et al, 2007**).

Aliments de bétail

Les rebuts et les noyaux de dattes constituent des sous produits intéressants pour l'alimentation du bétail.

La farine des noyaux de dattes peut être incorporé avec un taux de 10 % dans l'alimentation des poulets sans influencer négativement leurs performances. (**Khenissa et Ziani, 1991; Guattieri et Rappaccini, 1994**).

Chapitre 2: Données sur les levures

1. Généralités:

Le mot levure provient du mot latin « levare » qui se traduit par « lever » (**Oteng Gyang., 1984**).

Les levures sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par leur caractère unicellulaire et l'absence de vrai mycélium. Elles sont microscopiques et immobiles (**Guiraud et Galzy, 1998**).

Les cellules de levure sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques ou de forme plus spécifiques (**Bourgeois et Larpent, 1996**).

Elles se présentent isolées, en paires, en chaînes ou en petits amas. La taille des cellules de levures est très variable suivant les espèces : 2.5-10.5µm large contre 4.5-21µm de longueur. (**Larpent, 1991; Bourgeois et Larpent, 1996**).

Les levures se reproduisent par bourgeonnement ou fission. Elles peuvent présenter deux modes de reproduction : végétative et sexuée (**Larpent, 1992**).

Les levures sont très répandues : saprophytes sur les fruits, le nectar de fleurs « milieux sucrés », dans le tube digestif des animaux et des insectes, comme elles peuvent persister libres dans le sol (**Scriban, 1993**).

Quelque 500 espèces de levures réparties dans 60 genres sont maintenant identifiées et diverses classifications ont été proposées.

Classification des levures:

- Les levures appartiennent à trois classes de champignons:
- Les ascomycètes
- Les basidiomycètes
- Les deutéromycètes

A l'intérieur de ces classes les levures sont regroupées en ordre famille, genre, et espèces.

La classification des levures est une partie intégrante de celle des champignons, la distinction des genres repose essentiellement sur les caractéristiques morphologiques des cellules végétatives et des spores. La répartition des genres est faite à partir des critères

2. caractéristiques des levures:

La morphologie:

Les cellules végétatives des levures peuvent être sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques, ces formes



Figure N°6: L'aspect morphologique d'une levure

La structure:

La structure cellulaire est de type eucaryote. La paroi rigide est de 15 à 230 nm d'épaisseur. Elle est caractérisée par la présence de polysaccharides (surtout mannane et glucane, la chitine, des protéines dont certaines sont des enzymes (invertase).

Le noyau est entouré d'une membrane qui persiste pendant la division cellulaire, le nombre de chromosomes est variable suivant les levures. (Bourgeois et Larpent, 1996; Larpent, 1991). (Figure N°7).

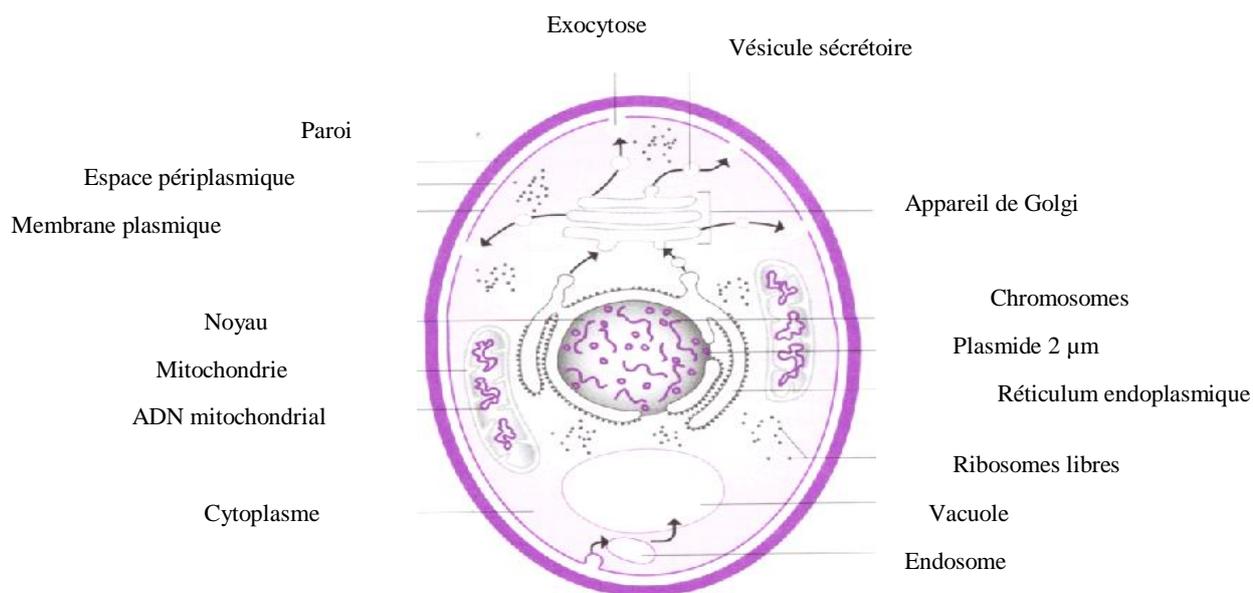


Figure N°7: Représentation idéalisée d'une cellule de levure. (Thuriaux, 2004)

La composition chimique d'une levure est très variable suivant l'espèce, en moyenne elle s'établit dans le (tableau N° 12).

**Tableau N°12 : Composition moyenne d'une levure sèche.
(Lavollay, 1968)**

<i>Composants</i>	<i>Teneurs (en %) pour 100G</i>
Eau	05
Protides	45
Cendres	03
Lipides	38
Glucides	38

La reproduction:

La reproduction végétative se fait généralement par bourgeonnement dans certaines conditions de culture les levures sporogènes peuvent se reproduire par voie sexuée. (Bourgeois et Larpent, 1996)

La nutrition :

Les levures comme tous les champignons, sont hétérotrophes exigent donc (Thuriaux, 2004):

- Une source de carbone et d'énergie: glucose, amidon, mélasse, huiles...etc. Le carbone est le composé majeur de la cellule de levure, environ 50% du poids sec. certaines levures peuvent utiliser une large gamme de composés carbonés mais d'autre assimilent seulement un petit nombre de composés. (Bourgeois et Leveau, 1991)

- Une source d'azote: sels d'ammonium ou de nitrate, acide amines, farine de soja, peptone, extrait de levure...etc.. La levure préfère consommer l'azote qui comporte les critères suivants (Botton et al, 1990):

- Pénétration rapide ;
- conversion rapide dans la cellule avec le minimum d'étapes en ammoniac au acide glutamique ou les deux;
- pas d'effet secondaire toxique. (Bouix et Leveau, 1993)

- Une source de sels minéraux: P, S, Cl, Mg...etc.

Rôle des levures dans l'industrie alimentaire :

Les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elle participent à la fabrication de nombreux produits (brasserie, fromagerie, vinification...etc.), mais aussi à la valorisation des déchets agricoles et industriels et à la production des protéines. Actuellement leur rôle est fondamentale dans les industries de fermentation: les levures utilisent les substrats sucrés ou amylacés pour la production de certains métabolites comme: l'alcool (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*); les nucléotides, ainsi pour la production des antibiotiques. .

Les levures ayant une grande valeur nutritive peuvent entrer dans la ration alimentaire animale ou humaine. Dans ce but, la production de «levure aliment» ou P.O.U (protéines d'organismes unicellulaires) s'effectue sur des substrats très variés. (Scriban, 1999).

Le Tableau N°13 donne la production industrielle de la levure alimentaire sur divers substrats.

Tableau N° 13: Production industrielle de la levure alimentaire sur divers substrats
(Simon et Meunier, 1970)

Types de substrat	Organismes utilisés	Rendement en% calculé sur le sucre consommé	Protéins en %
Mêlasse de betterave	<i>Torulopsis utilis</i>		
Mêlasse de canne	<i>T. utilis</i>	55	50
Liqueur de	<i>T. utilis</i>	48	51
bisulfite	<i>Hanseluna anomala</i>	39	50
Hydrolysant de bois	<i>T. utilis</i>	35-40	-
Résidu et	/	47-52	50
fermentation	<i>S. cerevisiae</i>	53	50
Jus de fruits	<i>T. utilis</i>	43-53	50
Mêlasse de betterave	<i>T. utilis</i>	40-45	40-48
Lactosérum		45	45-50
Produits pétroliers			

3. Données sur *Saccharomyces cerevisiae*:

3.1. Définition :

Saccharomyces cerevisiae vient du mot saccharose qui signifie «sucre», mycès « champignon », tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», c'est un terme scientifique, nom qu'on donnait autrefois à la bière, c'est un terme utilisé pour désigner le petit champignon microscopique qui compose les différentes sortes de levures qu'on utilise pour la fermentation. Elle est littéralement connue comme levure du sucre (Larpent et Gourgoud, 1985).

Saccharomyces cerevisiae est une cellule sphérique, ovoïde ou allongée de taille très variable « 3-10µm x 4-14µm ». Certaines cellules sont cylindriques et de grande taille, jusqu'à 20µm de long ou plus (Larpent, 1991).

Classification:

La place de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans la classification des êtres vivants est brièvement rappelée au (Tableau N°14).

Tableau N° 14 : Classification de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

(Larpent, 1992)

La place de la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans le monde vivant est :

Règne : *Protistes-Eucaryotes*

Classe : *Ascomycetes*

Sous-classe : *Hemiascomycetes*

Ordre : *Endomycetales*

Famille : *Saccharomycetaceae*

Sous-famille : *Saccharomycetoideae*

Genre : *Saccharomyces*

Espèce : *Saccharomyces cerevisiae*)

3.2. Morphologie :

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

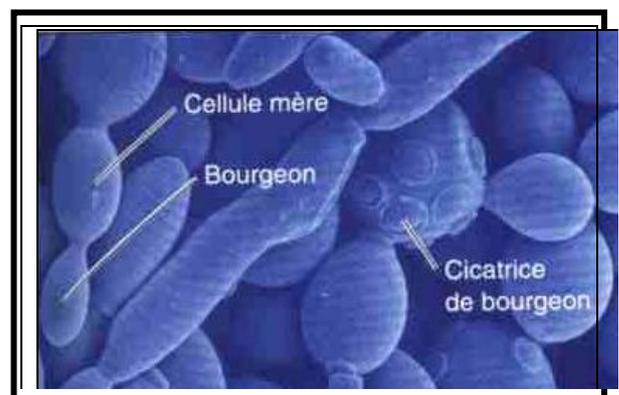


Fig. (8). Micrographie de *S. cerevisiae* (Tortora et Anagnostakos, 1987)

3.3. Reproduction:

C'est un espèce de levure de bourgeonnement, les principales étapes de bourgeonnement de la levure de *S. cerevisiae* sont représentés dans la (Figure9). La souche *S. cerevisiae* capable de bourgeonner une trentaine de fois avant de mourir, et la paroi conserve toutes les cicatrices laissées par les cellules filles. Dans certaines conditions, elle est capable de fusionner pour donner une cellule diploïde qui peut se multiplier par voie végétative, ces cellules peuvent également sporuler pour donner quatre spores haploïdes (Bourgeois et Leveau, 1991).

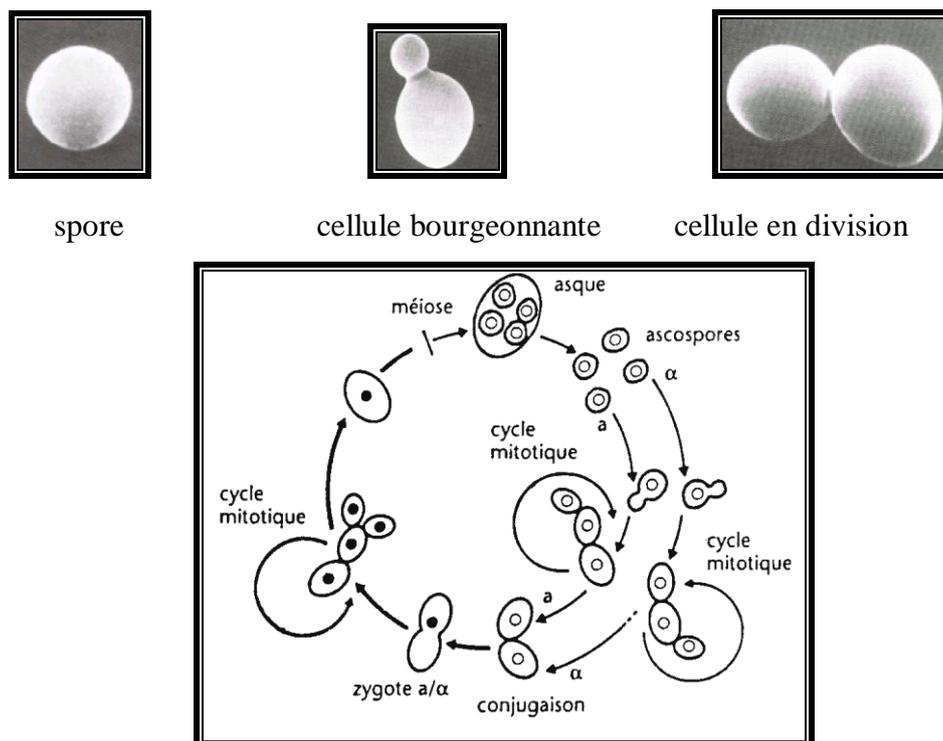


Figure N°9: Cycle biologique de la levure *S. cerevisiae*. (Bourgeois et Larpent, 1996)

- **Reproduction végétative :**

La reproduction végétative des levures ascomycètes se fait par bourgeonnement. La formation du bourgeon débute par une invagination de la cellule, puis le bourgeon grossit avant de se séparer de la cellule mère. Le bourgeonnement peut être polaire, bipolaire ou multilatéral, ce dernier caractérise les cellules de *Saccharomyces* (Bouix et Leveau, 1993)

- **Reproduction sexuée :**

Les levures ascomycètes présentent des phénomènes de reproduction sexuée par formation d'un asque renfermant des ascospores issues de la méiose. La diploïdisation s'effectue entre deux cellules indépendantes en donnant un zygote (Bouix et Leveau, 1993)

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la conjugaison se produit en 6 à 8 heures après la mise en présence des deux types sexuels (Larpent, 1991).

- **Notion de temps de régénération:**

C'est le temps nécessaire à la duplication cellulaire, il varie d'une levure à une autre, il est également subordonné aux conditions de culture (substrat nutritifs, aération, température, pH, du milieu) (Larpent, 1991)

3.4. Principes d'identification de la levure :

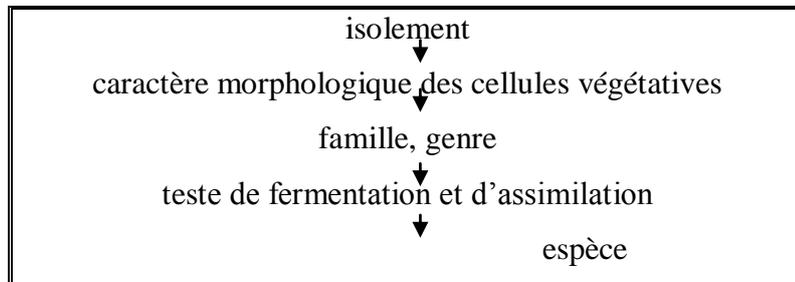


Figure N°10: Système classique d'identification.

(Guiraud et Galzy, 1980)

3.5. Caractéristiques biochimiques :

Tableau N°15: Caractéristiques biochimiques de *S. cerevisiae*.

(Guiraud et Galzy, 1998)

Caractéristiques	utilisation
Nitrate	Négative
Urée	Négative
Fermentation	Positive
Sucres : * Glucose	+f
* Galactose	x
* Saccharose	+f
* Maltose	x
* Therhalose	x
* Lactose	-
* Cellobiose	x
* Melibiose	-
* Raffinose	+f
* Xylose	-
Ethanol	x

Utilisation des substrats carbonés: + ou -. Assimilation : f. Variable ou non. Déterminé : x

Selon Simon et Munier (1970), la levure *S. cerevisiae* se distingue essentiellement par sa teneur en protéine, en acides aminés, ainsi qu'en vitamines de groupe «B»

3.6. Condition de culture de la levure *Saccharomyces cerevisiae*:

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement. (Bouix et Leveau, 1993)

Exigences culturelles :

- **Le pH:** *S. cerevisiae* présente l'avantage de croître sur un milieu acide, pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle préfère un pH compris entre 4-4.5. (Revuz, 1979)
- **La température:** la température de croissance est variable suivant les espèces de levures. La température convenable pour la levure *S. cerevisiae* est entre 25°C et 35°C, ce sont des mésophiles. (Larpen et Gourgoud, 1985)
- **L'aération:** la levure s'adapte à deux modes de vie en présence et en absence d'oxygène, et pour le but d'homogénéiser la circulation dans le fermenteur il est nécessaire d'adapter d'oxygène sous forme d'air filtré par un coton. (Revuz., 1979)
- **La pression osmotique:** la levure *S. cerevisiae* est une espèce osmophile qui développe sur des milieux à forte concentration en sucres et en sel mais avec un métabolisme lent au contraire de certaines espèces. (Noui, 2001)

3.7. Besoins nutritionnels:

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

- **L'eau:** représente 75% du poids total cellulaire. Elle doit être en grande quantité dans le milieu;
- **Le carbone:** la souche *S. cerevisiae* utilise les glucides simples (hexoses) et des disaccharides mais elle est incapable d'utiliser les pentoses. (tableau N°15);
- **L'azote:** toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ions d'ammonium, et l'urée pour constituer des protéines ; acide nucléique et des vitamines. (Larpen, 1992);
Selon Bourgeois et Larpen (1996) la levure *S. cerevisiae* est incapable d'utiliser le nitrate;
- **Les sels minéraux:**
 - **Potassium:** le potassium est l'élément minéral quantitativement le plus important dans la levure.
 - **Phosphore:** se trouve inclus dans les acides nucléiques et les nucléosides, la concentration en ion phosphate (PO_4^{-3}) régule la synthèse des lipides et des glucides.
 - **Soufre:** 60% du soufre est incorporé dans les protéines et sous forme de inorganique libre. Les *Saccharomyces* sont également capable d'utiliser le sulfite et le thiosulfate.

- **Magnésium:** il est nécessaire au bon fonctionnement d'une centaine d'enzymes de métabolisme. (**Bouix et Leveau, 1993**)
 - **Calcium:** le calcium indispensable à la croissance mais joue un rôle de stimulateur chez *S. cerevisiae*. (**Larpen, 1992**)
- **Les oligo-éléments:** sont nécessaires à l'état de trace, de l'ordre du mg/l du milieu de culture. Mais sont indispensables pour la croissance et la multiplication des levures, aussi joue un rôle dans l'activation de certaines réactions enzymatiques ainsi dans la construction de certaines vitamines et coenzymes. (**Bourgeois et Larpen, 1996**)
- **Les vitamines:** l'apport de vitamines est indispensable pour assurer une bonne croissance et une meilleure activité fermentaire de la levure.
- Pour *S. cerevisiae*, les besoins en thiamine B₁ est de 5 mg/l les besoins en biotine sont de l'ordre de 1mg/l. La quantité nécessaire en vitamines B₆ est de 6.25µg/l. (**Bouix et Leveau, 1993**)

3.8. Principales applications de *Saccharomyces cerevisiae*:

Les levures représentent certainement le groupe le plus important de micro-organismes exploités par l'homme.

Depuis la plus haute antiquité, elles ont joué un rôle de premier ordre dans l'alimentation humaine : vinification, panification, brasserie, fromagerie.

Elles sont des champignons qui peuvent être développés industriellement soit, pour :

- Leur utilisation en tant qu'agents de fermentation, la production industrielle la plus importante dans ce domaine étant celle la levure de boulangerie (panification).
- leur utilisation à l'état mort en tant qu'aliment comme source de protéines et de vitamines. (**Staron, 1977**)

Tableau №16 : Les principales applications de *S. cerevisiae*
(**Camoni, 1990**)

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

Chapitre 3: Techniques d'isolement des levures et étude des aptitudes Technologiques

1- Techniques d'isolement des levures :

La plupart des aliments contenant des levures contiennent également des bactéries et parfois des moisissures. L'isolement des levures en vue de leur identification ou de leur numération peut donc demander l'emploi de milieux sélectifs dotés de propriétés antibactériennes et si possible antifongiques.

Milieux de culture liquide :

- milieu YG.
- milieu YPG ou YM.
- milieu de Sabouraud.

Milieux gélosés pour la culture :

- Le milieu « pomme de terre » glucosé gélosé (PDA).
- Le milieu extrait de levure tamponné (BYA) ou milieu de Davis.
- Le milieu OGA à l'extrait de levure glucosé.

L'isolement peut être rendu sélectif par acidification du milieu (pH 3.5 à 4.5). Cette acidification est efficace vis-à-vis de nombreuses bactéries mais les moisissures et les bactéries acidophiles se développent dans ces conditions. Il est donc nécessaire d'utiliser d'autres agents, en particulier des antibiotiques et antifongiques spécifiques pour les produits contenant ces germes.

Le développement des champignons filamenteux peut être inhibé par l'adjonction au milieu: Thiabendazole (3mg/litre de milieu), Propionate de sodium (0,3%).

Le développement des bactéries peut être inhibé par l'adjonction de : chloramphénicol (0.5mg/ml), Pénicilline/ Streptomycine (20µ/ ml, 40µ/ ml) et Terramycine (0.1 mg/ ml).

Les agents antimicrobiens sont en général stérilisés à part par filtration et rajoutés stérilement au milieu en surfusion (**Guiraud et Galzy,1980**).

1.1. Isolement différentiel de levures :

Le problème consiste à mettre en évidence d'une souche recherchée au sein d'une population de levures.

Les souches *Saccharomyces cerevisiae* peuvent être mis en évidence sur les milieux WLN ou WLD (wallerstein nutrient ou wallerstein différentiel) contenant du vert de bromocrésol. Les boîtesensemencées sont incubées à 25°C, trois jours.

Seules les souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont incapables de réduire le colorant et forment des colonies lisses vert sombre alors que les souches sauvages donnent des colonies blanches ou faiblement colorées ou plissées.

Aussi les *Saccharomyces* et en particulier *Saccharomyces cerevisiae* ne peut utiliser la lysine comme seule source d'azote alors que les autres levures (surtout souches sauvages) le peuvent généralement.

Les méthodes de détection par culture sur milieux sélectifs peuvent être améliorées du point de vue de la sensibilité et de la rapidité par l'utilisation des techniques de filtration sur membrane et d'examen microscopique des micro-colonies. (Guiraud et Galzy,1980)

1.2. Techniques d'identification des levures :

L'identification des levures fait appel à des caractères cultureux et morphologiques, à la sexualité et à des critères physiologiques. (Guiraud et Galzy,1980)

1.2.1. Caractères cultureux :

Aspect en milieu liquide : Les caractères cultureux sont étudiés en milieu liquide (milieu YG, YPG ou YM). Les cultures sont incubées 2 ou 3 jours à 25°C puis laissés à la température du laboratoire pendant une semaine

L'aspect de la culture présente les caractères suivants : dépôt poussiéreux, dépôt granuleux ou mie de pain, voile lisse, croissance le long des parois, trouble, suspension ou îlots. (Guiraud et Galzy,1980)

Aspect en milieu solide : Les caractères cultureux sont étudiés en milieu solide incliné les mêmes milieux liquides précédents gélosés à 2% (Guiraud et Galzy,1980)

Les espèces de levures ont été inoculées en boîte de Pétri par la méthode de stries, incubées 3 jours à 25°C puis laissées à température ambiante une semaine. La culture est présentée selon les caractères suivants : forme de la colonie, couleur du pigment, opacité et surface.

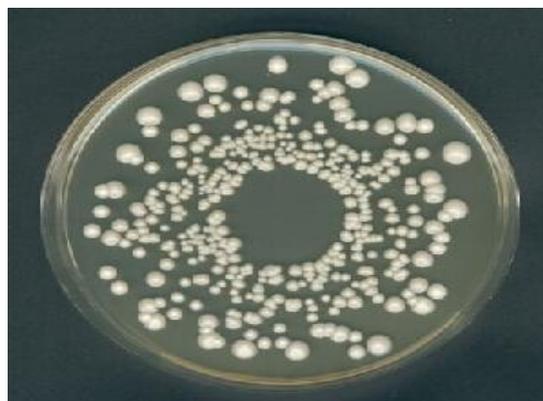


FIGURE N°11 : Caractères cultureux en milieu solide (Sabouraud).

1.2.2. Caractères morphologiques :

Morphologie cellulaire normale et Mode de multiplication végétative :

Ces caractères sont étudiés par examens microscopiques qui sont effectués sur les cultures ayant permis l'étude des caractères cultureux. Les examens ont lieu à partir du milieu liquide et du milieu solide au bout de 3 jours et de 1 mois.

La préparation microscopique utilisée est l'état frais. Objectif (10 puis 40).

L'étude microscopique permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de divisions des cellules ainsi que de mesurer leur taille. (**Guiraud et Galzy,1980**).

L'observation au microscope de lames colorées au bleu de méthylène nous a permis de définir les formes : sphériques, ovoïdes, allongées, cylindriques, en forme de citron ou triangulaire. (**Larpen, 1991**)

La reproduction végétative peut se faire par bourgeonnement ou scissiparité ou quelque fois combinaison des deux. (**Bouix et Leveau, 1993**).

Certaines levures se reproduisent végétativement par scissiparité. Il y a formation d'un septum sans aucune construction de la paroi de la cellule. Quant le processus est terminé, les cellules filles peuvent se séparer.

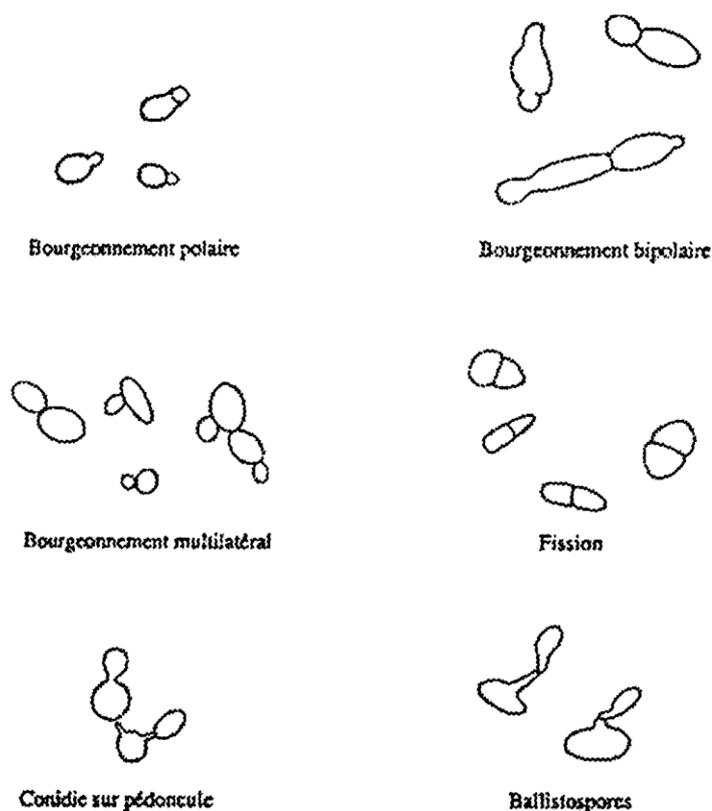


Figure N°12: Mode de reproduction végétative (**Bouix et Leveau, 1993**)

Dans certaines de culture, les levures peuvent donner des formes mycéliennes. Les cellules bourgeonnantes peuvent rester attachées les unes aux autres et la chaîne de cellules ainsi constituée est un pseudomycélium. Dans un pseudomycélium, il n'y a pas de cloisons visibles, les extrémités des cellules intercalaires sont courtes et la cellule terminale est plus courte ou approximativement égale à la cellule adjacente (**Larpent, 1991**).

Test de filamentation :

Les filaments sont parfois mis en évidence par l'examen microscopique à l'état frais.

La recherche systématique de l'aptitude à la filamentation d'une souche doit cependant s'effectuer après culture sur un milieu spécifique tel que le YPGA. Les levures sont inoculées par une strie sur les lames recouvertes de milieu YPGA et placées dans une boîte de pétri en verre stérile.

La lame recouverte d'une lamelle puis incubation une semaine à 25°C. Comme il existe d'autres milieux spécifiques tels que : GMA (corn meal agar ou maïs agar), PDA (potato dextrose) (**Guiraud et Galzy, 1980**).

Aptitude à former des spores :

C'est un caractère fondamental qui permet le classement des levures dans une des trois familles, mais il est difficile à mettre en évidence à partir de vieilles souches :

- Rondes chez *Saccharomyces*.
- Hémisphériques à bord saillant (chapeau) chez *Hausénula*.
- Réniformes chez *Pichia* ou fusiforme (**Guiraud et Galzy, 1980**).

Quelque soit le processus de formation, il est nécessaire de mettre en évidence les asques et les ascospores pour l'identification d'une levure, si elle est capable de la reproduction sexuée.

Les lames colorées au bleu de méthylène réalisées à partir de culture de levures en tubes gélosés inclinés de milieu de sporulation et incubés une semaine à un mois à 25°C . (**CALLON, 1997**).

Dans le cas des levures ascosporigènes, on note la forme des asques, leur facilité de rupture, le nombre et la forme des ascospores, leur position dans l'asque. (**Bouix et Leveau, 1993**)

1.2.3. Caractères biochimiques et physiologiques :

Les caractères morphologiques et sexuels permettent généralement d'identifier le genre alors que les caractéristiques biochimiques permettent de définir l'espèce de la levure. (Bouix et Leveau, 1993)

Fermentation des sucres:

La capacité ou l'incapacité des levures à fermenter les hydrates de carbone en éthanol et CO₂ est la caractéristique la plus utilisée pour différencier les espèces à l'intérieur, d'un genre.

Néanmoins elle peut être appliquée pour la définition de certains genres. L'étude du métabolisme des glucides par la voie de fermentation est réalisée en milieu liquide. Les milieux sont répartis en tubes renfermant chacun une cloche de Durham. Six sucres sont utilisés : glucose- galactose- maltose- saccharose- lactose- raffinose.

Les tubes sont incubés à 25°C 2 à 3 jours pour une première lecture. Puis des lectures sont faites tous les deux jours pendant 2 semaines. La fermentation se traduit par l'observation d'un dégagement gazeux dans la cloche de Durham. (Bouix et Leveau, 1993).

Utilisation des sources azotés:

Les levures assimilent généralement l'ammonium, souvent les peptones, les acides aminés et parfois l'urée, les nitrates. Toutes les levures ne sont pas aptes à utiliser des sources d'azote minéral.

En effet, *Candida utilis* assimile les nitrates alors que *Saccharomyces cerevisiae* en est incapable. Les levures qui assimilent les nitrates utilisent également les nitrites mais la réciproque n'est pas vraie.

Parmi les sources d'azote minéral, les sels minéraux et les sources d'azotes organique dont les acides aminés sont essentiellement les plus utilisées. La méthode utilisée est la même que celle employée pour l'assimilation des glucides, mais le milieu contient du glucose et ne comporte aucune trace d'azote : milieu CB de wickerham. (Bourgeois et Larpent, 1996).

2- Moyens d'étude des aptitudes technologiques d'une levure boulangère:

Les principales caractéristiques qui guideront le choix d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* en vue d'une application industrielle pour son utilisation en boulangerie est une vitesse de croissance la plus élevée possible et un bon rendement sur le milieu utilisé.

Les autres caractéristiques importantes sont :

- La croissance rapide;
- La culture faible;
- La fourniture de quantité abondante;
- La conservation de ses caractères biochimique, sans risque de variation génétique;
- Pouvoir fermentaire élevée;
- La disponibilité.

2.1. Cinétique de croissance en « Batch » :

La culture discontinue, où culture batch, consiste à inoculer un milieu nutritif riche, contenu dans une cuve (milieu fermé non renouvelé) lorsque l'un des facteurs indispensables au développement des micro-organisme s'épuise, la croissance s'arrête.

La culture est terminée avec l'arrêt de la croissance s'il s'agit de la production de biomasse ; où avec l'arrêt de l'activité métabolique s'il s'agit de la biosynthèse d'un produit.

2.2. Taux de croissance :

C'est pendant la phase exponentielle que la culture croît à un taux de croissance maximum et constant, c'est aussi pendant cette phase qu'on évalue la performance de la croissance d'une souche microbienne par son taux de croissance maximum.

Le taux de croissance maximum doit se situer aux environs de 0,25/h, c'est à dire que l'accroissement horaire de la biomasse ne doit pas dépasser 35%, car au delà de ce taux, on observe une chute brutale du rendement par augmentation du quotient respiratoire, qui s'en suit d'une production anormale d'alcool. (Reviere, 1975).

2.3. Temps de génération :

Le temps de génération est le temps nécessaire à une levure pour se diviser ou temps de dédoublement de la population il est calculé selon la relation suivante :

$$g (h) = \frac{\log 2}{\mu}$$

ou: γ = taux de croissance.

2.4. Rendement pondéral :

Le rendement de croissance est calculé lorsque la phase maximum est atteinte, il est défini comme étant le rapport entre la quantité de biomasse formée en poids sec à la fin de la croissance et la quantité de sucres consommée. (Gerald, 1973).

3. Données sur la fermentation et la production de la biomasse.

3.1. Définition:

Le terme de fermentation est apparu au 16^{ème} siècle il vient du latin « **Ferver =bouillir** »

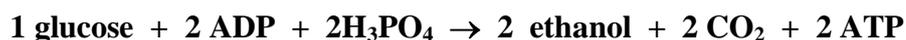
(dégagement des bulles de CO₂ dans un mout de vinification) (**Bourat, 1992**).

La fermentation est tout processus métabolique au cours duquel est utilisé un microorganisme spécifique pour la libération de l'énergie. (**Gaillard et al., 1995**)

D'après Tortora et al (2003), on peut définir la fermentation comme un processus qui:

- Libère de l'énergie par la dégradation de sucres ou d'autres molécules organiques;
- Ne nécessite pas d'oxygène (O₂), mais peut parfois se poursuivre en sa présence,
- Ne nécessite pas l'utilisation du cycle de Krebs ni d'une chaîne de transport des électrons,
- Utilise une molécule organique comme accepteur d'électron final.

La fermentation chez les *Saccharomyces* peut être représentée par l'équation de bilan global suivante:



3.2. Modalités de conduite de la fermentation:

La fermentation est assurée selon deux modalités:

Fermentation en discontinu:

Est appelée aussi «**batch**» consiste à cultiver les microorganismes dans une cuve «milieu fermé non renouvelé» pour les récolter ou extraire les produits formés après une «période de temps déterminée».

Fermentation «fed-batch»: c'est un processus où le fermenteur est alimenté par des ajouts successifs de milieu ou de substrat ceci permet d'éviter les problèmes d'inhibition liées par exemple à la toxicité d'un substrat. (**Figure N°14**)

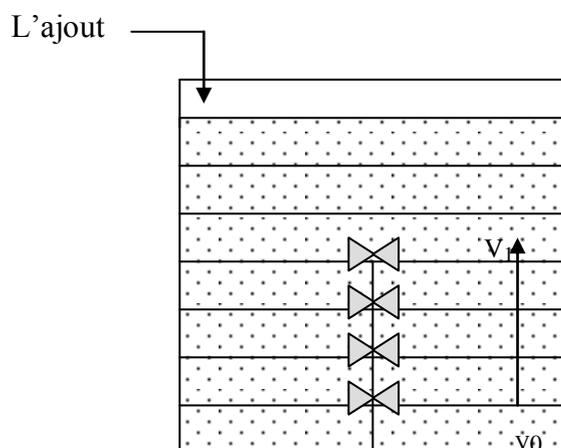


Figure N°13: Représentation schématique d'une fermentation en mode « Fed-Batch »
(**Guiraud et Galzy, 1998**)

La culture en « Fed-Batch » est utilisée dans l'industrie lorsque l'on veut optimiser l'apport d'un nutriment susceptible d'avoir un effet réducteur sur la croissance. (**Bourat, 1992**)

Fermentation en continu :

Elle est caractérisée par un apport continu du milieu nutritif et un soutirage d'une quantité égale du milieu réactionnel, c'est-à-dire le milieu nutritif est introduit avec un débit D dans le fermenteur de volume V , tandis que le fluide soutiré est évacué avec le même débit D . (**Noui., 2001**).

3.3. Optimisation de la fermentation :

Traditionnellement, les fermentations industrielles sont conduites en maintenant les variables d'action constantes.

Leurs valeurs sont souvent déterminées à partir de critères biologiques en visant la meilleure productivité (concentration la plus élevée possible en fin de fermentation obtenue la plus rapidement possible) au moindre risque de contamination par exemple.

Il est évidemment envisageable de les faire varier dans le temps, dans le but d'améliorer les résultats. C'est ce que permet la mise en œuvre des techniques d'optimisation.

Une fermentation comme toute opération industrielle, est soumise à la notion d'indice de performance dans lequel entrent en particulier le temps d'opération, la production, la consommation d'énergie, de matière première, le rendement.

D'où la notion de critères selon les quels l'optimisation doit être faite et qui sont de trois sortes:

- maximisation des concentrations des produits de fermentation que l'on cherche à obtenir (biomasse microbienne, métabolites);
- minimisation du temps de fermentation;
- minimisation des coûts d'opération.

Les deux premiers critères impliquent la définition des conditions conduisant aux meilleurs profils des courbes de croissance et de production. (**Scriban., 1999**)

Il est possible d'agir sur les différents paramètres opératoires biochimiques et physiques pour optimiser la mise en œuvre de la fermentation et atteindre les meilleurs rendements de conversion tels que:

- les concentrations des nutriments : surtout le carbone et l'azote;
- les profils d'alimentation ;
- la température ;
- le pH ;

- l'agitation et l'aération ;
- les temps de réaction. (Scriban., 1997)

L'optimisation d'un procédé aérobie de production de levure vise à l'obtention des concentrations et de productivités maximales en cellules. Dans le cas de la levure de boulangerie *S. cerevisiae*, la qualité boulangère finale est un autre critère important. C'est en général par la sélection judicieuse d'une souche, d'un milieu de culture et d'un procédé qui sont obtenues les meilleures performances. (Larpent., 1991)

3.4. Quelques usages industriels des types de fermentation

Le **tableau 17** résume les principaux usages industriels des divers types de fermentations.

Tableau N° 17: Les principales usages industriel de la fermentation.
(Tortora et Anagnostakos, 1987)

Type de fermentation	Produit final de la fermentation	Usage industriel ou commercial	Matière première	Microorganisme
Fermentation alcoolique	Ethanol (anaérobie)	* Bière * vin * carburant	*Extrait de malt *raisin ou autre jus de fruits * déchet agricoles	* <i>S. cerevisiae</i> * <i>S. cerevisiae</i> sous espèce <i>ellipsoideus</i> * <i>S. cerevisiae</i>
Fermentation homolactique	Acide lactique (anaérobie)	* fromage * yaourt * pain de seigle	} * lait * grain, sucre	* <i>Lactobacillus streptococcus</i> * <i>L. bulgaricus</i>
Fermentation acétique	Acide acétique (aérobie)	* vinaigres	* Ethanol	* <i>Acetobacter</i>
Fermentation propionique	Acide propionique et CO ₂	* gruyère * emmental	} * acide lactique	* <i>Propionibacterium freudenreichii</i>
Fermentation butylène glycolique	Acétone et butanol	Usage pharmaceutique Et industriel	* mélasse	* <i>Clostridium acetobutylicum</i>
Fermentation hétérolactique	glycérol	Usage pharmaceutique Et industriel	* mélasse	* <i>S. cerevisiae</i>

3.5. Production de biomasse :

La biomasse est un terme voisin de protéines de biosynthèse ou «singl cell proteins».

C'est l'ensemble de la production microbiologique brute obtenue par fermentation, que la souche utilisée soit une levure, une bactérie, une moisissure ou une algue. (Adrian et al, 1981)

Selon Bauer et Raetz (1992) l'utilisation de microorganisme à trois types de production à savoir:

- la production de biomasse
- la biosynthèse de métabolites
- les biotransformations

3.5.1. Mécanisme de la formation de la biomasse :

La réaction de formation de biomasse peut s'écrire sous la forme suivante:



Où:

- S, T, U, V : sont naturellement connus pour un substrat donné.
- W, X, Y, Z : peuvent être déterminés par l'analyse élémentaire des constituant du germe. (Scriban., 1999)

3.5.2. Application de la production de biomasse :

La production de biomasse constitue souvent le but de fermentation industrielle :

- Production des protéines d'organismes unicellulaires essentiellement les levures
- Production des métabolites (vitamines, enzymes, antibiotiques, etc.)
- Production de levure diététique
- Production de levains pour les industries de fermentation
- Production d'agents biologique pour bioconversion (catalyseur)
- Production pour des applications particulières par exemple la lutte biologique (action insecticide) (Scriban., 1999)

3.5.3. Optimisation de la production de la biomasse :

Des travaux ont été réalisé par Noui (2001) et Benbrahim (2001) sur l'optimisation de la production de la biomasse sur trois types d'extrait de datte (Tinissine, Tantboucht ; et rebuts de Deglet-Nour), où il a agit sur l'apport de substrat azoté, par l'utilisation de « L'urée, le dihydrogénophosphate d'ammonium et le sulfate d'ammonium ». A l'exception de l'urée, qui est apporté au milieu avec une concentration constante dans les trois essais, les deux autres substrats sont ajoutés à des concentrations différentes.

Les principaux résultats de ce travail sont :

- La souche de levure s'adapte mieux sur l'extrait de Tinissine,
- Le dihydrogénophosphate d'ammonium constitue le meilleur substrat azoté, avec le quel le rendement pondéral est optimum, il est de l'ordre 24.15 par apport à 17.03 (essai 1 : les trois substrats sont égaux à une valeur de 15%) et 20.64 (essai 2 : le sulfate d'ammonium 22.5%), cette différence est due essentiellement aux variations de la concentration des sels d'ammonium d'un essai à l'autre.

Chapitre 4: Données sur l'invertase

1. Généralité sur les enzymes :

1.1. Définition :

Terme actuellement utilisé au féminin provenant de l'allemand « **das enzyme** ». L'enzyme (holoenzyme) est un système protidique (apoenzyme) associé à un cofacteur non protidique (coenzyme ou groupe prosthétique), qui peut être un cation, une vitamines... (**Figure N°14**).

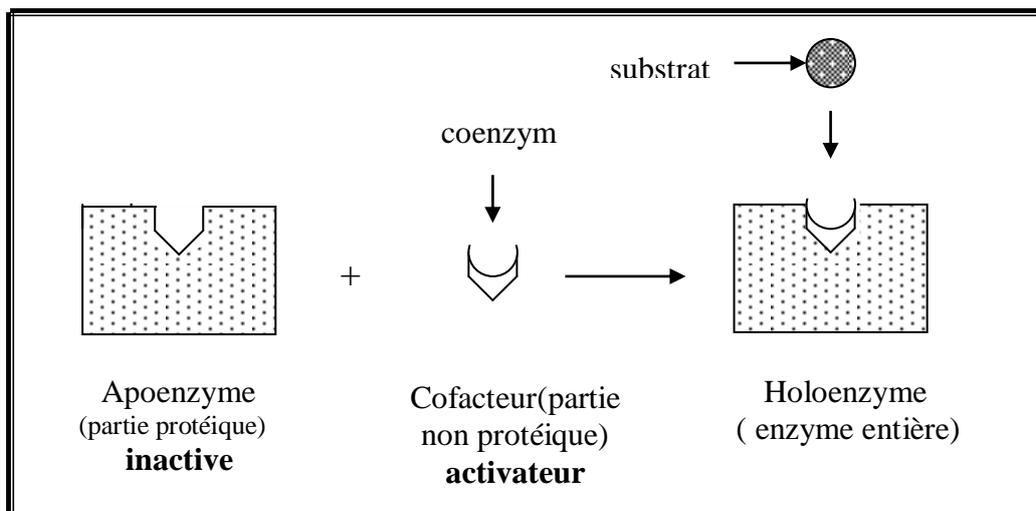


Figure N°14: Les composants d'une holoenzyme (enzyme entière)
(Tortora et Anagnostakos, 1987)

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques, de nature protidique qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possible, qu'elles accélèrent par activation spécifique. Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre d'une réaction sans la modifier.

Les enzymes sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bio-industrie, utilisées en génie génétique pour la biosynthèse des métabolites intéressants.

Toutes les enzymes sont des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaire. Bon nombre d'entre elles doivent leur activité à la présence d'un composant non protéique appelé *cofacteur*.

Le *cofacteur* peut être soit un ion inorganique, soit une molécule complexe, organique ou métall-organique appelée *coenzyme* (Scriban, 1999).

La spécificité est l'un des caractères fondamentaux de l'activité des enzymes. Cette spécificité est double, une enzyme ne catalyse qu'une réaction et n'agit que sur un substrat ou une classe de substrat (Audigié et al, 1978).

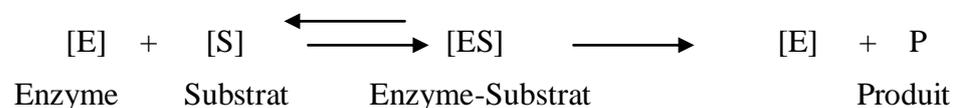
Le site ou centre actif d'une enzyme est une région localisée où se fixe et se transforme le substrat ce site possède deux fonctions essentielles :

- Il intervient dans la reconnaissance spatiale du substrat en formant avec lui des liaisons non covalentes;
- Il participe à la transformation chimique de substrat.

1.2. Cinétique de la réaction enzymatique :

On peut décrire le processus enzymatique par deux étapes successives, la première est la formation d'un complexe enzyme-substrat (ES) par association rapide et réversible entre le substrat et le site actif de l'enzyme [ES].

La seconde étape est une succession de réactions impliquant la transformation du complexe en produit [P] avec libération de l'enzyme. L'ensemble de processus enzymatique s'écrit donc :



1.3. Vitesse de la réaction enzymatique :

Pour mesurer l'activité d'une enzyme sur un substrat, il suffit de mesurer la vitesse de réaction enzymatique exprimée par la quantité de substrat détruite ou par la quantité de produit formé en fonction du temps.

On obtient une courbe où la vitesse initiale de la réaction est déterminée par la pente de la tangente à la courbe.

La vitesse de réaction dépend de deux paramètres fondamentaux :

- La concentration en enzyme : la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration d'enzyme
- **La concentration en substrat :** La vitesse d'une réaction enzymatique dépend d'une façon non-linéaire de la teneur en substrat. Ceci résulte du mécanisme d'action de l'enzyme qui forme tout d'abord un complexe enzyme-substrat avant que celui-ci ne libère le produit ainsi lorsque la concentration en substrat s'élève, l'enzyme devient saturée et la vitesse de réaction tend vers une valeur maximale.

Elle dépend aussi d'autres facteurs :

- L'affinité de l'enzyme au substrat
- Le temps de contact de l'enzyme et le substrat
- Des substances chimiques (activateurs ou inhibiteurs)
- Des facteurs physiques : pH et température (**Bauer et Raetz,1992**).

1.4. Classification des enzymes :

Les enzymes sont classées selon le type de réaction qu'elles catalysent en six groupes, le nom des enzymes est formé de deux parties. La première est le nom de substrat. La deuxième prend le suffixe -ase et désigne le type de réaction catalysée.

Un certain nombre d'enzymes sont désignées à l'aide de nom commun, consacré par l'usage (pepsine, trypsine etc.). Chaque enzyme possède un numéro de code EC « enzyme commission » (**Bauer et Raetz, 1992 ; Pelmont, 1993**)

Tableau №18 : Classification des enzymes basée sur le type de réaction chimique catalysée. (Tortora et Anagnostakos, 1987)

Classe	Type de réaction chimique catalysée	Exemples
oxydoréductase	Réaction d'oxydoréduction au cours desquelles des atomes d'oxygène et d'hydrogène sont gagnés ou perdus	Cytochrome oxydase, lactate déhydrogénase
transférase	Transfert de groupements fonctionnels, tels que groupement amine, groupement acétyle ou groupement phosphate	Acétate kinase, alanine désaminase
hydrolase	Hydrolyse	Lipase, invertase
lyase	Elimination de groupements d'atomes sans Hydrolyse	oxalate décarboxylase, isocitrate lyase
isomérase	Redistribution d'atomes dans une molécule	glucose-phosphate isomérase, alanine racémase
ligase	Combinaison de deux molécules (à l'aide d'énergie habituellement obtenue par dégradation d'A	Acétyl-CoA synthétase, A ligase

1.5. Rôle des enzymes en technologie alimentaire :

- Elles sont les catalyseurs de la cellule vivante, elles sont donc présentes dans les matières premières dont elles influencent la saveur, la texture, la couleur, ainsi que les propriétés de conservation

- les enzymes sont utilisées comme des auxiliaires techniques pour accroître la qualité des produits telle les propriétés organoleptiques nutritives ainsi que les paramètres physico-chimiques comme la viscosité, la texture, la solubilité ou encore l'aptitude à la conservation des produits alimentaires (**Bauer et Raetz, 1992**)

1.6. Application des enzymes en agroalimentaire :

Parmi les enzymes actuellement connues, une vingtaine sont disponibles à l'échelle technique pour des applications industrielles. Dans l'industrie alimentaire se sont les branches sucrières et laitières qui sont les plus grands consommateurs d'enzymes ainsi que le montre ce tableau (**Bauer et Raetz, 1992**).

Dans les industries agroalimentaires, les enzymes peuvent jouer différents rôles à plusieurs niveaux :

- Amélioration de la composition des matières premières et/ou de leurs procédés de transformation;
- Obtention de produits nouveaux ou de meilleures qualités naturelles de matières premières et ainsi participer à la standardisation de la transformation;
- Les enzymes peuvent aussi intervenir au cours de procédé de transformation lui-même et jouer alors le rôle d'outils technologiques;
- Elles permettent parfois l'obtention de produits intermédiaires ou finis différents et sont alors des outils de valorisation des matières premières;
- Les enzymes interviennent également pour améliorer les qualités du produit fini, en particulier au niveau organoleptique. (Larreta., 1997)

Dans l'industrie agroalimentaire, ce sont les branches sucrières et laitières qui sont les plus grands consommateurs d'enzymes. (Tableau 19)

Tableau №19 : Quelques applications des enzymes produites par fermentation. (Baduel, 2002)

Le secteur	L'enzyme	L'application
Détergents	Protéase, amylase, lipase, cellulose	Amélioration des performances, diminution la température et du temps de lavage
Amidonnerie	α -amylase, amyloglucosidase, glucose isomérase, xylanase, inolinase cyclomaltodextrine,	Liquéfaction de l'amidon, production de glucose, hydrolyse des xylènes et inulines, production de cyclodextrines
Industrie alimentaire	Amylase, glucose oxydase, lipase, protéase, cellulase	Dégradation des amidons et du gluten en boulangerie, et extraction pour le cellulase
	α -acétolactate décarboxylase, β -glucanase	Préparation des matières pour la brasserie
	α -acétolactate décarboxylase β -galactosidase pectinase, invertase,	Préparation des jus de fruits (pectinase). Hydrolyse de saccharose dans les confiserie (invertase)
Synthèse de médication	Pénicilline acylase, glutarylacylase, lipase, protéase, oxydoréductase	Production d'antibiotiques (pénicillines), céphalosporines, dédoublement, chimie chirale.

2. Préparation industrielle des enzymes :

Les enzymes peuvent avoir plusieurs origines :

- Une origine végétale
- Une origine animale
- Une origine microbienne

**Tableau N° 20 : Les principales origines des enzymes.
(Scriban., 1999)**

L'origine	L'enzyme	Le nom d'espèce
Végétale	Les protéases	Papaïne <i>carica papaya</i>
Animale	Pepsine	Les bovins
Microbienne	Invertase	Levure <i>S. cerevisiae</i>

2.1. Enzyme d'origine microbienne

Les cellules microbiennes sont les plus largement utilisées pour obtenir une bonne sécrétion d'enzyme. (Gilbert et Pierre, 1988).

La production industrielle d'enzyme est orientée vers la fermentation, les principaux avantages des enzymes sont les suivants :

- Une production indépendante des contraintes saisonnières et géographiques
- Une possibilité d'utilisation de matière première bon marché;
- Des rendements de production pouvant être augmentés de façon importante par l'amélioration des conditions de fermentation

La production industrielle d'enzymes suppose donc un certain nombre d'étapes.

2.2. Définition de l'enzyme recherchée :

Il est nécessaire de déterminer les propriétés que cette enzyme devra posséder :

- ❑ **Spécificité :** bien que dans l'industrie, les enzymes soient souvent utilisés pour hydrolyser des macromolécules complexes, dont les sites de coupure nécessitent généralement l'utilisation d'un type d'enzyme précis.
- ❑ **L'optimum de pH :** ce facteur a une influence variable selon les enzymes, chaque enzyme est activée à un intervalle de pH précis.
- ❑ **L'optimum de température :**

Généralement, les utilisations souhaitent disposer d'enzyme supportant des températures élevées, de telles températures préservent la stérilité du milieu de réaction.

2.3. Sélection de la souche microbienne :

Les plus importantes méthodes d'isollements utilisées étant les cultures d'enrichissement suivi d'une subculture sur milieu sélectif.

La souche isolée pour être définitivement retenue doit présenter un certain nombre de caractéristiques :

- Se développe dans un milieu simple et bon marché;
- Produire le moins possible de métabolites secondaires;
- Excréter l'enzyme de façon à ce que celui ci soit facilement séparée et purifiée;
- Ne pas conduire aux différents polluants;
- Ne pas être pathogène ou produire des produits toxiques (Bouix et Leveau, 1993).

2.4. Production d'enzyme par fermentation

Traditionnellement, les enzymes microbiennes étaient produites par culture en surface, en couche mince sur milieu liquide ou milieu semi –solide, cette technique est encore utilisée pour certaines productions (enzyme d'origine fongique).

Mais cette technique présente des difficultés au niveau de contrôle de température d'aération et d'humidité. C'est pourquoi les cultures submergées sont maintenant préférées aux cultures de surface.

Les cultures en milieu liquide agité sont mieux adaptées au différent contrôle par des méthodes modernes et réduisent les risques de contamination. De plus elles se prêtent mieux aux opérations d'extrapolation et d'optimisation pour ce passage de fermenteur pilote de laboratoire au fermenteur industriel (**Scriban, 1999**).

Extraction et purification

Après la fermentation les enzymes doivent être séparées des cultures et de milieu par les opérations simples telle que ; Centrifugation, filtration, précipitation.

L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires nécessitent un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques.

Dans le cas des enzymes endocellulaires leur récupération exigent une étape supplémentaire de broyage ou de la lyse des cellules microbiennes, puis ces enzymes sont purifiées comme les enzymes exocellulaire. (**Gilberre et Pierre, 1988; Scriban 1999**).

Préparation enzymatique commerciale

Les enzymes peuvent être commercialisées sous différentes formes : liquides, concentrée, granulée, immobilisée.

Les formes en poudre préparées par déshydratation (atomisation) sont généralement d'une très bonne conservation sans précaution particulière

Les produits finis sont contrôlés pour :

- leur activité enzymatique
- Leur qualité microbiologique : absence de germes pathogènes
- Leur stabilité à la conservation. (**Gilberre et Pierre, 1988**).

3. Données sur l'invertase :

3.1. Historique :

L'invertase présente un grand intérêt historique dans le développement de l'enzymologie. Ce fut l'un des premiers enzymes caractérisés en 1833 par Persoz, la plus part des premières recherches sur la cinétique d'action des enzymes sont effectuées avec l'invertase de levure (**Javillier et al., 1964**).

3.2. Définition de l'invertase:

L'invertase est une enzyme périplasmique produite par la levure *saccharomyces cerevisiae*. Donc il n'est pas indispensable de l'extraire pour qu'elle agisse. Elle hydrolyse le saccharose en glucose et fructose.

Le nom officiel pour l'invertase est la β -fructofuranosidase (E C 3.2.1.26) qui indique que la réaction catalysée par cette enzyme est l'hydrolyse de β -fructofuranoside.

L'espace périplasmique: C'est le seul site de localisation de l'invertase et la phosphatase acide dans les levures. (**Larpent., 1991**)

Parmi les grandes enzymes industrielles, l'invertase n'occupe plus qu'un rang modeste cependant, son intérêt demeure très grand, à plus d'un titre :

Economiquement, sa présence dans des nombreuses levures permet de transformée chaque année environ 10 millions de tonne de mélasse

Scientifiquement : l'invertase reste un modèle d'avenir à cause de sa morphologie et son patrimoine génétique (**Gilbert et Pierre, 1988**).

3.3. Production de l'invertase par fermentation

L'invertase est produite dans un milieu de culture constitué d'un mélange de :

- Source de carbone (mélasse);
- L'azote apporté sous forme de phosphate d'ammonium;
- Les sels minéraux essentiels (potassium, magnésium);

Les conditions de fermentations sont choisies pour éviter la fermentation alcoolique :

- Bonne aération.
- Alimentation en sucre pour maintenir le taux suffisamment bas (5 à 10 g/l).
- Le pH est réglé de 4.5 à 5.5 par l'ammoniaque.
- La température se situe entre 26°C et 28°C.

3.4. Extraction :

L'invertase est fixée sur la paroi cellulaire. Le moût de fermentation est traité pour séparer les cellules, le plus généralement par centrifugation, après un ou deux lavages la crème de levure ainsi obtenue est refroidie.

Les parois fragiles sont rompues par des traitements mécanique et thermique légers par exemple, le séchage de la crème de levure (**Gilbert et Pierre, 1988**).

3.5. Séchage

Par définition le séchage est l'opération ayant pour but d'éliminer par évaporation l'eau d'un corps humide (solide ou liquide), le produit finale obtenu étant toujours un solide (**Bimbenet et al, 2002**).

Certains enzymes subissent un séchage lors de leur transformation et ou de leur conservation. Pour l'invertase, il s'agit d'une opération qui entre dans les étapes de l'extraction, suivi par un broyage ayant pour but de désintégrer les parois cellulaires et libérer l'enzyme. Le séchage entre aussi dans la conservation de l'enzyme, où les formes déshydratées présentent généralement une meilleure stabilité à la conservation (**Gilbert et Pierre, 1988; Scriban, 1999**).

Techniques et appareils de séchage :

Seules les méthodes de séchage douces peuvent être appliquées à des bio-produits comme les enzymes. Les procédés de séchage utilisés peuvent être classés en trois catégories principales :

- Séchage par l'air chaud, à la pression atmosphérique,
- Le séchage sous vide (sous basse pression),
- Lyophilisation (**Bauer, 1992**).

Séchage par l'air chaud, à la pression atmosphérique :

Selon **Alais et Linden (1992)**, un séchage par atomisation ou dans un séchoir à cylindre par un traitement à haute température de 70°-110°C peut entraîner une désintégration des parois des cellules des levures.

Bien que les températures y soient élevées, les bio- produits dans ce procédé sont ménagées, l'évaporation de l'eau abaisse la température des particules (**Bauer et Raetz, 1992**).

Plusieurs types d'appareils de séchage sont utilisés dans ce procédé :

- Sécheur à atomisation (le plus utilisée);
- Sécheur à cylindre rotatif ;
- Sécheur à lit fluidise. (**Cheftel et Cheftel, 1978**)

Séchage sous vide (sous basse pression):

Le procédé est avantageux par le fait que l'évaporation de l'eau est facilitée à pression réduite de (0.5 à 7cm hg) et permet l'ébullition de l'eau à basse température inférieure à 45°C, il présente les avantages suivant :

- la diffusion de l'eau se fait plus rapidement sous forme de vapeur
- les températures basses sont favorables aux produits sensibles à la chaleur (les enzymes)
- des séchoirs de vide partiels sont employés
- sécheur à plateau
- sécheur à bande mobile (**Cheftel et Cheftel, 1977**)

Lyophilisation:

C'est une technique récente, et largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique et biochimique, en raison de sa particularité elle permet d'obtenir des produits fins de haute qualité, le cycle de séchage se déroule en deux phases principales:

- La phase de sublimation proprement dite « dessiccation » : élimine environ 90 % de l'eau qui amène le produit à une humidité de l'ordre de 15%
- La phase de désorption ou dessiccation secondaire qui élimine le 10% d'eau liée restant et qui aboutit à un produit d'une humidité de 2 à 6% cette phase consiste à une vaporisation sous vide à température positive de 20° à 60°C.

Le produit lyophilisé est très hygroscopique et poreux ce qui impose un emballage rigoureusement étanche (**Planche, 1980; Michèle et Frederic, 2000**).

La dénaturation thermique des enzymes :

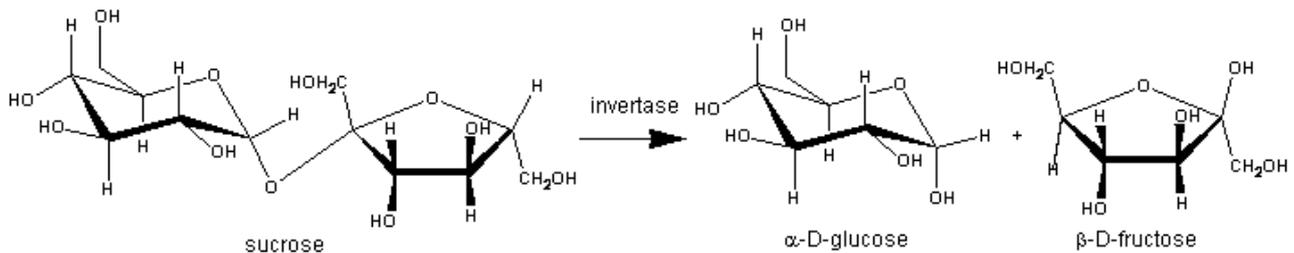
L'étude de la dénaturation enzymatique montre une disparition de l'activité enzymatique proportionnelle à la quantité des protéines dénaturées qui résulte d'une modification de la structure spatiale sans aucune rupture de liaison peptidique donc sans décomposition.

La plus part des enzymes sont détruit par le chauffage au-dessus de 80°C d'autre résiste à 100°C, lorsque l'enzyme est un système complexe, il se peut qu'une partie d'enzyme (coenzyme) soit thermostable, mais la partie protéique (apoenzyme) est dénaturée. (**Javillier et al, 1964 ; Audigié et al, 1988 ; Alais et Linden, 1992**).

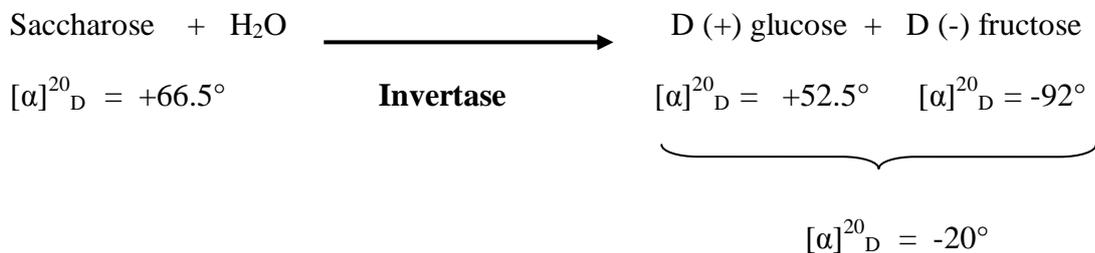
3.6. La bioconversion :

La bioconversion peut être réalisée par l'enzyme ou par les cellules elle-même libre ou fixé. L'intérêt de la bioconversion réside dans le fait que les transformations catalysées s'effectuent dans des conditions expérimentales (pH et températures) et que les molécules sont modifiée de façon spécifique et sa réaction secondaire (Scriban,1999).

Le principal substrat de l'invertase est le saccharose. L'invertase scinde le saccharose Dextrogyre $\alpha = +66.6^\circ$ en une molécule de glucose également Dextrogyre $\alpha = +52.5^\circ$ et une molécule de fructose lévogyre $\alpha = -92^\circ$ (Scriban, 1999).



On parle de l'inversion parce que le pouvoir rotatoire de la solution vis à vis de la lumière polarisée est inversé par l'hydrolyse il passe de $\alpha = +66.5^\circ$ (solution de saccharose) à $\alpha = -20^\circ$ (solution de sucre invertis).



L'inversion provoque une élévation de la solubilité de sucre de la solution ainsi un pouvoir sucrant passant de 1 à 1.1, elle diminue aussi le risque de développement des moisissures et levures à cause de l'activité de l'eau très basse. (Javillier et al, 1964 ; Gilbert et Pierre, 1988).

Les conditions de l'inversion sont :

Selon **Guerin et al. (1978)**, les conditions normales pour l'inversion enzymatique totale du saccharose sont les suivantes:

- La concentration initiale en poids de 50 à 68 % saccharose;
- Concentration en enzyme:0.005 à 0.02 % du poids du substrat;
- Température entre 60 et 70°C;
- pH entre 4.5 et 5.5 dont l'ajustement se fait par l'acide acétique ou l'acide lactique.

Le sucre invertis

On appelle le mélange obtenu sucre invertis, il est largement répandu on le trouve à l'état naturel dans le miel.

Sur le plan industriel le sucre invertis est produit soit par :

- **Catalyse acide** : utilisée traditionnellement, conduit à des sirops fortement minéralisés et très colorés.
- **Catalyse enzymatique** : est particulièrement adapté à la production de sucre invertis à très haute degrés, ils donnent des sirops doux qui se cristallisent moins probablement, ils sont également exempt de sous produits colorés (**Linden, 1994**).

3.7. Intérêt de l'invertase :

Dans la pratique industrielle, l'invertase est généralement utilisée pour la production de deux types de sirop invertis :

- l'invertis moyen qui renferme 50% de saccharose;
- l'invertis totale qui renferme 50% de glucose et 50% de fructose.

Les sucres invertis sont employés surtout en raison de leurs propriétés humectants dans :

- La confiserie humide (article à la gélatine, pâte de fruit ..),
- La pâtisserie industrielle (madeleine, brioche ,cake..),
- Les crèmes glacées, les sorbets, les produits laitiers frais, les boissons (crème de cassis);
- Industriellement, l'inverti total peut être utilisé pour la fabrication du fructose, du sorbitol et du mannitol (**Gilbert et Pierre, 1988**).

Chapitre 5: Matériel et Méthode

L'exploitation des systèmes micro-organismes/substrats permet actuellement de mettre au point des méthodes, qui donnent une valeur ajoutée plus intéressante à des produits agricoles à faible valeur marchande, c'est le cas de la production d'invertase par les levures sur milieu à base de datte et son exploitation pour produire des sucres invertis.

L'invertase, produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est principalement employée dans l'industrie agroalimentaire (confiserie) où le fructose est préféré au lieu du saccharose parce qu'il est plus doux et ne se cristallise pas facilement.

Pour la production et l'étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu à base de datte, nous avons travaillé selon le protocole expérimental suivant:

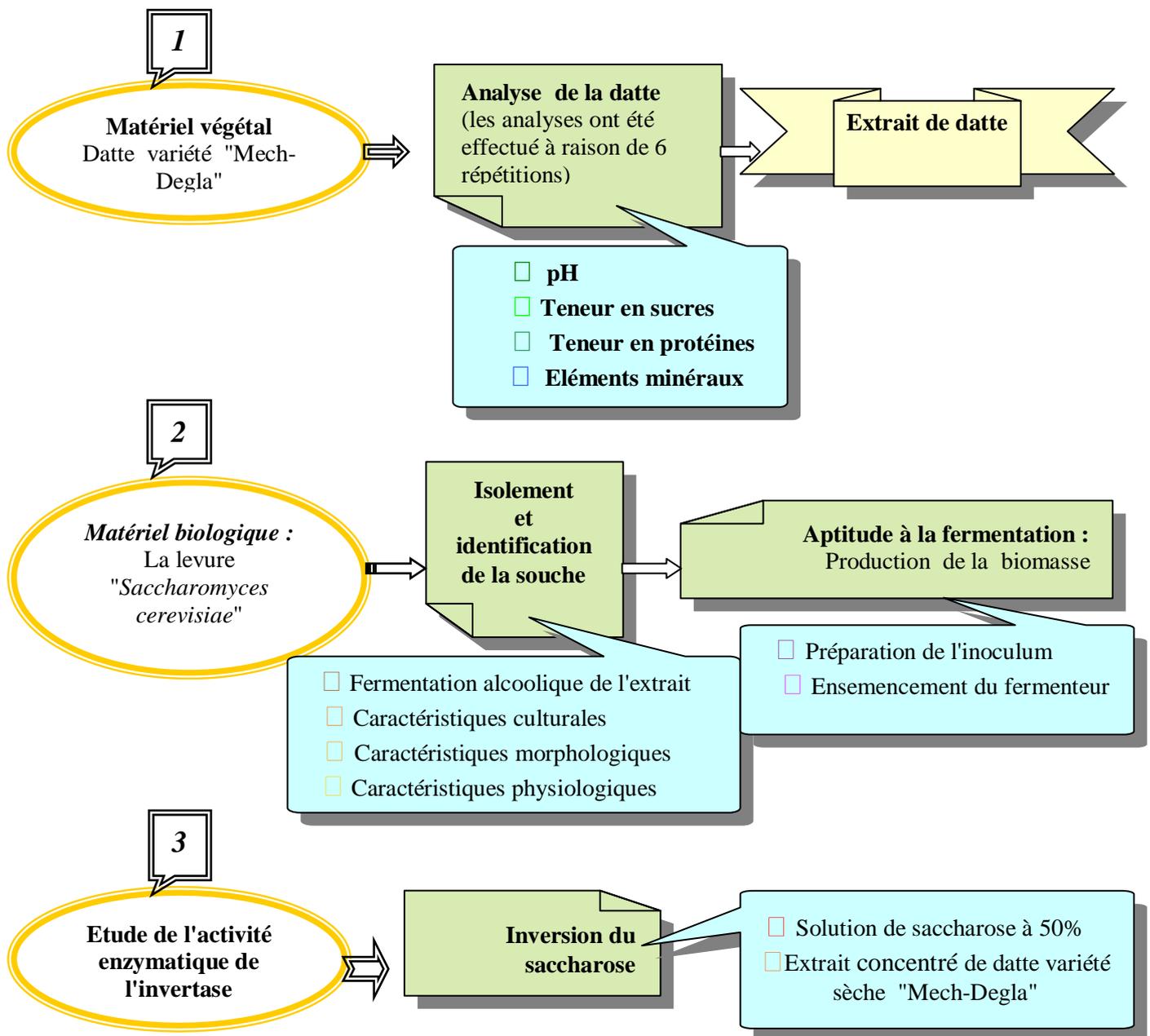


Figure N°15: Schéma de l'étude expérimentale

Il est à noter que toutes les analyses ont été réalisées au niveau du Département d'Agronomie - Université de Batna

1. Matériel végétal

1.1. Description et choix de la variété

Nous avons choisi dans notre étude un milieu à base de datte suivants certains critères qui sont :

- La disponibilité ;
- La composition (Richesse en sucre);
- Faible valeur marchande.

La variété de datte retenue dans cette étude est très répandue dans les palmeraies de la région Sud-Est. C'est la variété sèche : Mech-Degla (Figure N°16).

La datte Mech-Degla est de forme sub-cylindrique, légèrement rétrécie à son extrémité. A maturité, la datte est plutôt beige clair teinté d'un marron peu prononcé. L'épicarpe est ridé, peu brillant et cassant. Le mésocarpe est peu charnu de consistance sèche et de texture fibreuse (Belguedj, 1996).

Le choix de cette variété se justifie par son abondance au niveau national, sa faible valeur marchande, sa facilité de conservation (datte sèche) et sa composition : Il s'agit de sa richesse en sucres, un milieu favorable pour la croissance et le développement des levures.



Figure N°16 : Datte Mech-Degla

1.2. Méthodes d'analyses

1.2.1. Détermination de la teneur en eau

Principe

La teneur en eau est déterminée sur une partie aliquote de 5 g d'échantillon étalé dans une capsule en porcelaine puis séché dans une étuve, à la pression atmosphérique, à une température de 103 ± 2 °C.

Mode opératoire

- * Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15 mn à 103 ± 2 °C ;
- * Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;
- * Peser dans chaque capsule 5 g d'échantillon à une précision de $\pm 0,001$ g, et les placer dans l'étuve réglée à 103 ± 2 °C:
- * Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans le dessiccateur, et après refroidissement, les peser. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 mn).

la teneur en eau est égale à la perte de masse subie dans les conditions de la mesure (Audigie et al., 1978).

Expression des résultats

$$H\% = \frac{M_i - M_f}{P} \times 100$$

Soit :

H% : Teneur en eau ou humidité ;

M_i : Masse initiale « avant dessiccation » « Matière fraîche + capsule » ;

M_f : Masse finale « après dessiccation » « Matière sèche+ capsule » ;

P : Masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Matière sèche}\% = 100\% - \% \text{Humidité}$$

La détermination du pH, sucres réducteurs et sucres totaux ont été déterminés sur un extrait de datte. Les autres composants (protéines, cendres et éléments minéraux) ont été déterminés sur la pulpe de datte.

1.2.2. Préparation de l'extrait de datte :

Pour obtenir un extrait de datte variété sèche : «Mech-Degla », nous devons passer par les étapes suivantes :

- * Laver la pulpe fraîche de la datte obtenue à l'eau ;
- * Eliminer les loges capillaires et les noyaux des dattes ;

- * Couper la pulpe en petit morceau ;
- * Dans un bêcher ajouter une quantité d'eau distillée est égale à **5 fois** le poids de la pulpe fraîche préparée ;
- * Porter le mélange au Bain–marie à **70 - 75°C** pendant **1** heure, avec agitation de temps en temps ;
- * Après refroidissement, le mélange obtenu est en suite filtré ; la première filtration à l'aide d'un tissu (la gaze), la deuxième filtration sur papier filtre sous vide, ou sur sable ;
- * En suite peuvent être effectués les analyses sur l'extrait obtenu.

1.2.3. Détermination du pH (NF V 05-108, 1970)

Principe

Détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux électrodes en verre plongées dans une solution aqueuse de la pulpe de datte broyée.

Mode opératoire

- Placer datte variété sèche dans un bêcher;
- Procéder à la détermination du pH en prenant soins que l'électrode soit complètement immergée dans la solution.

1.2.4. Dosage des sucres :

1.2.4.1. Dosage des sucres totaux:

Méthode de phénol (méthode Dubois) :

Principe :

La méthode Dubois permet de doser les oses en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré. En présence de ces deux réactifs, les sucres donnent une couleur jaune crème, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux. La densité optique est déterminée à **490 nm (Linden, 1981)**.

Mode opératoire :

Cette méthode consiste à préparer, une gamme étalon à partir d'une solution de glucose à **0,01%**. Les données sont résumées dans le **Tableau N°21**.

Tableau N°21 : La gamme étalon pour le dosage des sucres totaux

Volume de glucose à 0,01 % (ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2	*
Eau distillée (ml)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	0	
Concentration en (µg)	0	40	80	120	160	200	
Densité optique	0	0,08	0,14	0,20	0,26	0,38	

- * Introduire dans un tube à essai **2ml** d'échantillon à doser (extrait de dtte préparé);

- * Ajouter à la gamme préparée et les tubes d'échantillon :
 - **0,1 ml** d'une solution de phénol à **80%** (voir l'annexe le mode de préparation) ;
 - **4 ml** d'acide sulfurique concentré ;
- * Mélanger lentement et légèrement ;
- * Laisser la réaction se faire à une température de **20 - 30°C** pendant **15 mn**, puis refroidir les tubes pour arrêter la réaction ;
- * Faire une lecture dans un spectrophotomètre UV visible à une longueur d'onde de **490 nm**.

1.2.4.2. Dosage des sucres réducteurs :

Principe :

Cette méthode basée sur la réduction de la liqueur de Fehling par les sucres réducteurs contenus dans l'échantillon (**Navarre, 1974**).

Condition de dosage : L'échantillon doit être privé de toutes les autres matières réductrices ; et dilué d'une façon que la quantité des sucres soit inférieure à **5 g / l**.

Mode opératoire :

Dans une première étape, étalonner la liqueur de Fehling à l'aide d'une solution de glucose à **5%**. En suite, par comparaison, on détermine la quantité des sucres contenue dans l'extrait de datte.

Etalonnage :

- Introduire dans un erlenmeyer :
 - **10ml** de solution de Fehling **A** (voir dans l'annexe le mode de préparation) ;
 - **10ml** de solution de Fehling **B**. (voir dans l'annexe le mode de préparation) ;
 - **30 ml** d'eau distillée ;
- Verser en très petites quantités, la solution de glucose à **5%** contenu dans une burette graduée, jusqu'à la décoloration complète de la liqueur de Fehling et la formation d'un précipité Cu_2O rouge.

Dosage :

- Remplacer la solution de glucose par l'extrait préparé et dilué;
- Introduire dans un erlenmeyer :
 - **10 ml** de solution de Fehling **A** ;
 - **10 ml** de la solution de Fehling **B** ;
 - **30 ml** d'eau distillée ;
- Opérer comme précédemment.

Expression des résultats :

$$R = \frac{5 \times N}{N'} \times f$$

Soit :

R : La quantité des sucres réducteurs en **g / litres** ;

N : Le nombre de **ml** de solution de glucose à **5%** utilisée ;

N' : Le nombre de **ml** de filtrat utiliser pour la décoloration de la liqueur de Fehling ;

f : Le facteur de dilution.

1.2.4.3. Teneur en saccharose :

La teneur en saccharose est obtenue par la différence entre la teneur en sucres totaux et les sucres réducteurs présents dans l'échantillon.

$$\% \text{ Saccharose} = \% \text{ Sucres totaux} - \% \text{ Sucres réducteurs.}$$

1.2.5. Détermination de la teneur en protéines Méthode de Kjeldhal :

Dans l'agroalimentaire, l'utilisation d'un facteur de conversion « F » fondé sur le taux moyen d'azote des protéines « $F = 100 / 16 = 6.25$ ». (Costes., 1981).

Les résultats sont donnés sous la forme suivante :

$$\% \text{ PROTEINES} = \% \text{ N} \times 6.25$$

Principe :

Le principe de la méthode est basé sur la transformation de l'azote organique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur et dosé après déplacement en milieu alcalin et distillation sous forme d'ammonium (Lecocq., 1965).

Réactifs :

- Acide sulfurique pur ;
- Sulfate de cuivre et de potassium (comme catalyseurs) ;
- Acide borique à 4% ;
- Indicateur coloré (mélange de bleu méthylène et rouge méthylène) ;
- Soude NaOH 4N ;
- Acide sulfurique pour la titration à 0.05N.

Mode opératoire :

- Avant de procéder au dosage de l'azote total l'échantillon doit subir une minéralisation. Pour cela, introduire dans un matras de minéralisation 0.2 g d'échantillon, ajoutez une pincée des catalyseurs (sulfate de cuivre et sulfate de potassium) ;
- Ajouter 15 ml d'acide sulfurique pur ;
- Nous utilisons un chauffage progressif ; d'abord une attaque au froid pendant 15mn jusqu'à l'apparition de vapeur blanche d'anhydride sulfurique ; puis le chauffage et rendu plus énergique (attaque à chaud) pendant 4 à 5 heures ;
- Après décoloration complète, la solution est refroidie et complétée à 100 ml avec de l'eau distillée ;
- La solution minéralisée, à laquelle nous ajoutons 20 ml de soude, est distillée ;
- Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique contenant l'indicateur coloré. L'excès d'ammoniac est alors dosé par l'acide sulfurique 0.05N.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N\% = V / V' \times (N - N') \times 0.05 \times 1.4 / P$$

Soit:

V : solution minéralisée et complétée 100 ml;

V' : volume de la soude ajoutée 20 ml ;

n : la quantité d'acide sulfurique lue après titration ;

n' : le témoin 0.2 ;

0.05 : la normalité d'acide sulfurique ;

P : poids de la prise d'échantillon 0.2 g.

1.2.6. Détermination de la teneur en cendres

Principe :

Le dosage des cendres est basé sur la destruction de toute matière organique sous l'effet de la température élevée (500°C) (Linden, 1981).

Mode opératoire :

Peser **0,5 -1 g** de matière sèche dans une capsule préalablement tarée ;

Faire passer la capsule au four à température de **500°C** pendant **5 heures** ;

Après refroidissement retirer la capsule ;

Expression des résultats :

$$\text{MO}\% = \frac{M_i - M_f}{P} \times 100$$

Soit :

MO% : Teneur en matière organique ;

M_i : Masse initiale « avant incinération » « Matière sèche + capsule » ;

M_f : Masse finale « après incinération » « Cendres + capsule » ;

P : Masse de prise d'essai.

La teneur en cendre est égale à :

$$\% \text{ Cendres} = 100 \% - \text{MO} \%$$

1.2.7. Analyse des éléments minéraux (K, Na et P)

Principe :

Le but de la minéralisation c'est la reprise des cendres obtenues précédemment sous forme liquide.

Selon **Laurent (1991)**, le dosage des éléments minéraux répond à **2** objectifs :

Connaissance de la valeur nutritionnelle par la détermination des éléments majeur et les oligo éléments ;

Vérification des taux de certains minéraux.

Mode opératoire :

* Après minéralisation de **0,5 g** de matière sèche, en va prendre les cendres obtenues ;

* Humecter lentement les cendres dans **3 ml** d'eau distillée et **3 ml** d'acide chlorhydrique concentré pour assurer une franche réaction acide ;

- * Chauffer sur un plaque chauffante sans dépasser **250°C** jusqu'à apparition des premières vapeurs ;
- * Ajoute **1 ml** d'eau bi-distillée puis filtrer sur papier sans cendre dans une fiole jaugée de **100ml** , rincer **3** ou **4 fois** à l'eau bi-distillée à **30 - 40°C** ;
- * Incinérer le papier filtre et son contenu pendant une demi-heure à **550°C** au maximum dans le four à moufle ;
- * Ressortir après refroidissement les capsules ;
- * Humecter une deuxième fois par **5 ml** acide chlorhydrique **37%** ;
- * Mettre les capsules pour la deuxième fois sur plaque chauffante jusqu'à apparition des premières vapeurs ;
- * Ajouter **1 ml** de **HCL** concentré ;
- * Ajouter **1ml** d'eau bi-distillée puis filtrer sur papier sans cendres dans la même fiole de jaugée de **100 ml** ;
- * Laver à l'eau bi-distillée tiède ;
- * Amener à **100 ml**, compléter à la jauge après refroidissement avec l'eau bi-distillée ;
- * Mettre **20 ml** de cette solution dans des tubes à essais.

Dosage du potassium et sodium :

Le dosage de sodium et potassium est réalisée par la spectrophotomètre à flamme.

Principe :

Consiste à pulvériser l'échantillon dans une flamme, l'intensité de l'émission lumineuse est en rapport avec la concentration en élément dissous. Les lecteurs de la densité optiques sont faites à des longueurs d'onde de **766,5 nm** pour le **potassium** et **590 nm** pour le sodium.

Dosage du phosphore :

Principe :

Le dosage du phosphore est réalisé par spectrophotomètre à longueur d'onde **650nm**, basé sur la formation d'un complexe d'acide phosphorique et d'acide molybdique.

L'addition d'un réactif sulfumolybdique, et d'une solution d'acide ascorbique à la solution mère, provoque par chauffage, le développement d'une coloration bleue, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration d'ortho phosphate.

Remarque :

Dans cette partie nous présentons seulement le principe de dosage de **K**, **Na**, et **P**, les détails concernant les méthodes sont présentés dans l'annexe.

2. Matériel biologique :

2.1. Choix de la souche :

Les impératifs qui guideront le choix de la souche sont les suivants :

- La croissance rapide ;
- La résistance aux contaminants ;
- La culture facile ;
- Un pouvoir fermentaire élevé ;
- Fourniture facile de l'enzyme nécessaire à la transformation recherchée ;
- la conservation des caractères biochimiques, sans risque de variation

génétique. (SIMON et MEUNIER, 1970)

Dans notre travail, nous avons choisi la levure « *Saccharomyces cerevisiae* » qui se développe mieux sur un milieu à base d'extrait de dattes, ce qui facilite son isolement.

La partie expérimentale est réalisée en deux étapes :

Première étape : Isolement et identification.

Deuxième étape : Les aptitudes à la fermentation (croissance).

2.2. Isolement et identification :

La souche de *Saccharomyces cerevisiae* est isolée à partir d'extrait de dattes variété « Mech -deglà ».

2.2.1. Préparation de l'extrait de dattes d'isolement :

Nous avons préparés deux extraits de dattes obtenus selon les étapes suivantes :

* Extrait de dattes N°1 :

- Elimination des loges capillaires et des noyaux ;
- Lavage de la pulpe de la datte à l'eau froide ;
- Coupe des dattes en petits morceaux ;
- Ajout à 75g de la pulpe 300ml d'eau distillée ;
- Chauffage du milieu préparé (dattes+eau distillée) à 65°C pendant 10 mn dans un bain marie avec agitation ;
- Refroidissement du mélange obtenu sous un courant d'eau froide ;
- Après obtention de l'extrait de dattes filtré, une vérification du Brix à l'aide d'un réfractomètre (le Brix de l'extrait de dattes préparé est 6% après filtration) ;
- Acidification du milieu par l'acide acétique (pH 5)

* Extrait de dattes N°2 :

Nous avons suivi les mêmes étapes de celles d'extrait de dattes précédentes les différences résident en :

- Ajout à 62.5g de dattes et 12.5g de saccharose 500ml d'eau distillée.
- Acidification du milieu par 3ml d'acide acétique (pH 5).
- Le Brix de cet extrait de dattes est 10.5%.

*** Répartition d'extrait de dattes d'isolement :**

L'extrait de dattes est réparti dans 8 erlenmeyers (**Tableau N° 22**) :

Tableau N° 22: Répartition des extraits d'isolement

Essais	Extrait d'isolement	solution de saccharose à 6%	Température d'incubation
Extrait N°1			
1	50 ml	-	ambiante
2	50 ml	-	30°C
3	25 ml	25 ml	ambiante
4	25 ml	25 ml	30°C
5	50 ml (chauffée 30 mn à 70°C)	-	ambiante
6	25 ml (chauffée 30 mn à 70°C)	25 ml	30°C
Extrait N°2			
7	50 ml	-	ambiante
8	50 ml (chauffée 30 mn à 70°C)	-	30°C

On laisse les erlenmeyers pendant quelques temps, durant lequel à chaque fois on vérifie la fermentation alcoolique. Voir **Figure N°17**.

REMARQUE :

Tous les erlenmeyers sont fermés avec du coton, du papier aluminium et étiquetés.

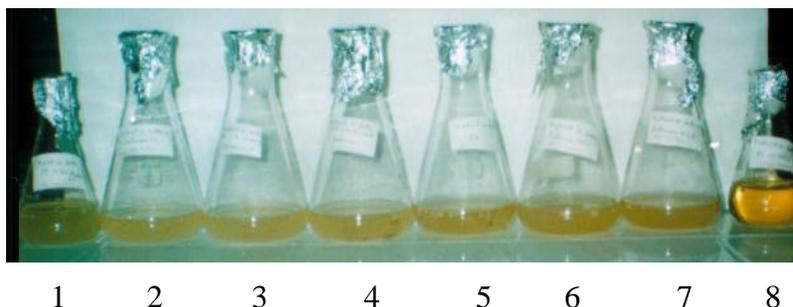


Figure N° 17 : Extraits de dattes d'isolement.

2.2.2. Caractéristiques culturelles :

Teste de croissance en milieu liquide :

Les cultures sont effectuées dans le milieu de base préparé au niveau du laboratoire :

• **préparation du milieu de base (milieu d'enrichissement)**

- Extrait de levure 4 g
- Peptone 5 g
- Glucose 25 g
- Phosphate mono potassique 0,55 g
- Chlorure de potassium 0,42 g
- Chlorure de calcium 0,12 g
- Chlorure ferrique 0,0025 g
- Sulfate de manganèse 0,0025 g
- Extrait de datte 50 ml
- Eau distillée (q.s.p.) 1000 ml

Le milieu préparé est conditionné dans des tubes à essais à raison de 9 ml par tube, ensuite autoclavé à 120°C pendant 20 min.

- **Les étapes d'isolement et purification :**

1. Cinq tubes du milieu d'enrichissement sont ensemencés par la culture positive puis, portés à l'incubation à 30°C, les observations de l'aspect des cultures se font après 48 heures d'incubation.
2. Ensemencement en stries a la surface de la gélose (Sabouraud) a l'aide d'une anse stérile trempée dans chacun des tubes positifs , ensuite incubation à 30°C pendant 48 heures.
3. Transfert des colonies caractéristiques (blanchâtres non pigmentés) du milieu solide vers le milieu liquide (milieu de base), ensuite incubation à 30°C pendant 48 h.
4. Après cette étape, la culture est ensemencée sur le même milieu utilisé pour la croissance en milieu liquide, mais gélosé a 2% qui est WLN modifié.

La préparation du milieu gélose WLN modifie:

- Milieu de base 100 ml;
 - Vert de bromocrésolé 22 mg;
 - Gélose (agar-agar) 2 g;
5. A partir des tubes positifs (fermentation alcoolique) des stries sont effectués à la surface du milieu gélose WLN modifié, à l'aide d'une anse stérile; les observations se font après 72 heures d'incubation à 25°C.
 6. Transfert des colonies caractéristiques (vertes, lisses et bombées) du WLN vers des tubes contenant le milieu de base (d'enrichissement) ; Ensuite, incubation à 30°C pendant 48 heures;
 7. La purification est effectuée par l'ensemencement en stries à la surface de la gélose (Sabouraud), incubation à 30°C pendant 48h.

2.2.3. Caractéristiques morphologiques de la cellule végétative :

La forme, la taille, le mode de bourgeonnement, ces caractéristiques sont étudiées sur des préparations microscopiques des cultures en milieu liquide, utilisées auparavant pour une observation au grossissement $\times 40$.

Test de filamentation :

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur lame de microscope, le milieu utilisé est le Potatoes Dextrose Agar.

- Préparation du milieu Potatoes Dextrose Agar :

Ce milieu est fondu puis déposé à la pipette sur une lame préalablement stérilisée dans une boîte de pétri.

Quand le milieu est solidifié, la levure à examiner est ensemencée en stries.

Il est préférable de mettre un peu d'eau stérile dans la boîte de pétri pour éviter la dessiccation du milieu pendant l'incubation.

Après 7 jours d'incubation à 30°C, la culture est examinée au microscope pour rechercher la présence éventuelle du pseudo mycélium ou mycélium.

2.2.4. Caractéristiques physiologiques :

Tests de fermentation des sucres :

Les tests de fermentation sont effectués avec des sucres très purs à des concentrations de 20%, sauf pour le raffinose 40%.

Les sucres étudiés sont : fructose, glucose, saccharose, galactose, ribose, mannose, sorbose, lactose, arabinose, sorbitol, xylose, raffinose.

Le milieu utilisé est celui proposé par Wickerham qui contient un indicateur coloré, le milieu est réparti en tubes à essai, à raison de 9ml par tube, et chaque tube reçoit une cloche de Durham.

Les sucres à tester sont mis séparément dans chaque tube, l'ensemble est ensuite autoclaver à 120c°, pendant 20 min.

Après refroidissement, les milieux sontensemencés et portés à l'incubation à 30°C pendant 72h.

Les tubes examinés chaque jour pour voir le pourcentage de gaz dégagé dans la cloche.

Test d'assimilation de composés azotés :

Les milieux utilisés pour tester la capacité des levures à assimiler les composés azotés, contiennent du glucose comme seule source de carbone, et enrichis avec des sources d'azote :

- Milieu 1 :

– Glucose	2 g
– Nitrate de potassium	0,0003 g
– Phosphate de sodium	0,008 g
– Sulfate de potassium	0,008 g
– Bleu de Bromothymol	0,003 g
– Biotine	2 µg
– Eau distillée	40 ml
- Milieu 2 :

– Glucose	2 g
– Urée	0,009 g
– Phosphate de sodium	0,008 g
– Sulfate de potassium	0,008 g
– Bleu de Bromothymol	0,003 g
– Biotine	2 µg
– Eau distillé	10 ml
- Milieu 3 :

– Glucose	2g
– Urée (NH ₂)CO	0,009 g
– Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH ₄) H ₂ PO ₄	0,008 g
– Sulfate d'ammonium (NH ₄) so ₄	0,008 g
– Bleu de Bromothymol	0,003 g
– Biotine	2 µg
– Eau distillé	10 ml

- Milieu 4 :

– Glucose	2g
– Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH ₄) H ₂ PO ₄	0,008 g
– Sulfate d'ammonium (NH ₄) so ₄	0,008 g
– Bleu de Bromothymol	0,003 g
– Biotine	2 µg
– Eau distillé	10 ml

Ces préparations sont conditionnées dans des flacons et autoclavées à 120°C pendant 20 min puis conservées à +4°C jusqu'à leurs utilisation.

Puisensemencé avec 1 ml d'une culture de levure, l'ensemble est maintenu à une température de 37°C pendant 24h.

2.3. Aptitudes à la fermentation (croissance) en Batch:

2.3.1. Entretien de la souche de levure :

La souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, est conservée dans un réfrigérateur à 4°C sur milieu gélose.

A partir de cette souche pure, une série de repiquage sur milieu enrichi ou sur gélose inclinée est effectuée chaque mois, pour le rajeunissement des cellules, de levure, ce qui permet d'utiliser la souche pour une longue durée.

- Préparation de la gélose inclinée :

– Extraits de levure	0,3 g
– Peptone	0,5 g
– Glucose	1 g
– Agar	2 g
– Eau distillée	100 g

Le milieu est réparti sur dix tubes à essai, à raison de 6 ml par tube, ensuite autoclavé l'ensemble à 120C° pendant 20 mn.

- **Ensemencement par stries :**

- Laisser refroidir les tubes à l'état incliné;
- Après refroidissement et, à partir d'un tube à essai des stries sont effectuées à la surface du milieu gélose à l'aide d'une anse stérile trempée dans un tube contenant la souche mère;
- Le tubeensemencé, est porté à l'incubation à 30C° pendant 24h;
- Après, incubation, on observe des colonies isolées, bien développées à la surface du milieu solide, ensuite conservation à 4 c°.

2.3.2. Préparation de l'inoculum :

Les souches entretenues sur la gélose inclinée doivent subir la veille de la fermentation, une réactivation sur milieu Carlsberg.

- Composition du milieu Carlsberg :
 - Extrait de levure 2 g
 - Saccharose 10 g
 - Sulfate de magnésium $MgSO_4$ a 20% 0.3 g
 - Dihydrogénophosphate d'ammonium $(NH_4)_2 H_2 PO_4$ a 20% 0.35g
 - Eau distillée 100 ml

On ajuste le PH a 4,5 par l'addition d'une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 1N)

Dans un erlenmeyers, on met 25 ml du milieu Carlsberg, ensuite autoclavage à $120^\circ C$ pendant 20 mn.

Après refroidissement, le milieu stérilisé estensemencé à l'aide d'une anse stérile à partir de la souche entretenue. Le contenu de l'erlenmmyer est homogénéisé, puis incubé a $30^\circ C$ pendant 15h.

2.3.3. Ensemencement du fermenteur :

L'ensemencement se fait par 25 ml de l'inoculum dans 1500 ml de milieu de culture « milieu non renouvelé » où l'extrait de dattes et les éléments minéraux sont ajoutés une seule fois au début de la fermentation (fermentation discontinue).

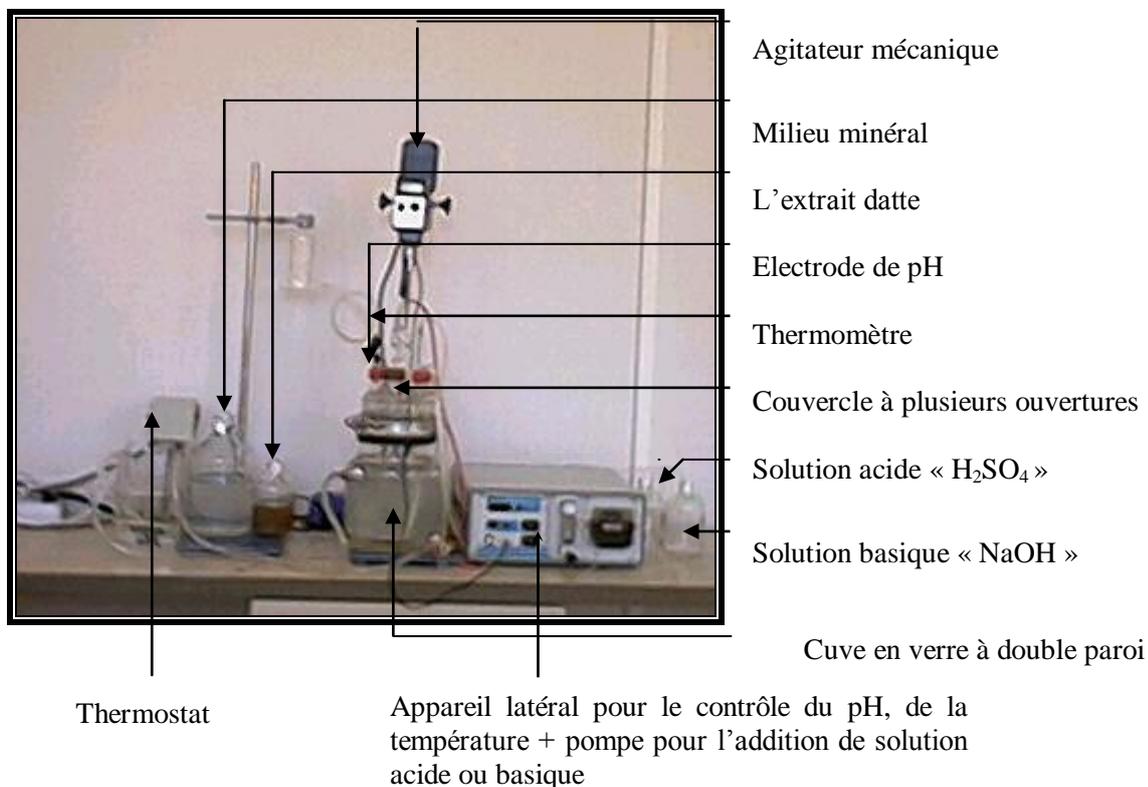


Figure N°18 : Fermenteur de paillasse à contrôle automatique type **H.W.S** :

Composition du milieu de fermentation :

Extrait de dattes	500 ml
Milieu minéral :	
- Urée (NH_2) CO_2	12,70 g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium (NH_4) H_2 PO_4	4,88 g
- Sulfate de magnésium Mg SO_4	0,44 g
- Sulfate d'ammonium (NH_4) SO_4	5,30 g
- Eau distillée (q.s.p)	1000ml

Conditions de culture :

1- Quantité de milieu de culture utilisé : Pour éviter des pertes éventuelles du milieu de culture par formation de mousse dans le fermenteur, les essais de fermentation ont été menés sur un volume utile de 1500 ml.

2- Le choix de la température : La température de culture est fixée à 30°C, température la plus utilisée en levurerie et à la quelle le taux de croissance est optimal et le rendement élevé.

3- Le choix du PH : Comme toutes les levures, *Saccharomyces cerevisiae* présente l'avantage de croître sur milieu acide pour le quel la plupart des bactéries ne se développent pas.

Pour nos études de fermentation, nous nous sommes fixé la valeur de pH entre (4,5 –5), pour éviter les contaminations bactériennes.

4- L'aération : L'oxygène nécessaire au développement des levures est apporté sous forme d'air à la base du fermenteur, à travers des orifices permettant d'insuffler de fines bulles d'air dans le milieu, le débit d'air est fixé a 150 l/h.

Pour éviter les risques de contaminations par l'air, celle-ci est filtrée à travers du coton avant de pénétrer dans le fermenteur.

5- L'agitation: Le but de l'agitation est de favoriser l'oxygénation du milieu en dispersant l'air en très fines bulles et en augmentant aussi la surface d'échange entre les cellules et le milieu nutritif.

6- Prélèvements et récoltes: Les prélèvements se font à l'aide d'un tuyau d'échantillonnage avec une prise d'essai de 50 ml chaque heure, ces prélèvements serviront pour l'étude de l'évolution de la croissance de la levure.

7- Contrôle de la pureté de la souche: La pureté de la souche est contrôlée au microscope, l'examen microscopique permet de déterminer les caractères morphologiques et le mode de reproduction de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

2.3.4. *Moyen d'étude de la croissance de la souche de levure :*

Le contrôle de la croissance de la levure a été réalisé par la mesure des paramètres suivants:

- La densité optique;
- La matière fraîche ;
- Le nombre de cellules ;
- Dosage des sucres.

Détermination de la densité optique :

On mesure l'absorption lumineuse de la suspension cellulaire à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde égale à 620 nm.

Comme la densité optique évolue très vite, nous avons préféré diluer nos échantillons au 1/20 de façon à rester dans la marge (0 - 1) de l'absorbance. La densité optique est proportionnelle à la masse cellulaire en suspension (LECLERC et al, 1977).

Détermination de la matière fraîche (biomasse):

La matière fraîche est séparée par centrifugation à 3500 tours/min pendant 15 min, une centrifugeuse type Sigma 3K20, le culot obtenu est pesé pour déterminer la quantité de matières fraîche produite puis déshydraté dans un séchoir (étuve ventilée) type Memmert à 65°C .

Dosage des sucres :

Nous avons dosé les sucres totaux du milieu de culture par la méthode réfractométrique. Ce dosage a été effectué avant et après fermentation dans le but de déterminer la quantité de sucres consommés.

❖ Mode opératoire :

Le surnageant est utilisé de la manière suivante :

- Prélever quelques gouttes du surnageant avec une pipette.
- Mettre une ou deux gouttes entre les deux prismes d'un réfractomètre type Abbé.
- Après, on procède à une lecture du degré Brix.

Evaluation du nombre des micro-organismes :

La croissance de la levure est suivie par la détermination de la concentration cellulaire (le nombre de cellules par unité de volume de culture). La méthode utilisée est une méthode directe par le comptage au microscope.

3. Etude de l'activité enzymatique de la biomasse (l'invertase):

3.1. Etude de l'activité enzymatique dans une solution de saccharose à 50%:

Le suivi de l'activité de l'invertase se fait par le dosage des sucres invertis ou de saccharose de la solution après la réaction (inversion) à l'aide d'un polarimètre type Schmidt Haench.

- Préparer une solution de saccharose à 50 %, filtrer stériliser cette solution;
- peser 0.02 g de la biomasse pour 100 ml de la solution de saccharose à 50 %;
- Répartir la solution obtenue (mélange) dans des tubes à essais;
- Porter les tubes au bain-marie à 60°C pendant toute l'opération;
- Avant chaque lecture diluer et filtrer la solution de chaque tube (Tableau: 15).
- vérifier le pH (pH entre 4.5 et 5.5), l'ajustement se fait par l'acide acétique ou l'acide lactique;
- La lecture se fait chaque 10 min pour la première heure puis chaque heure.

Dosage par polarimètre:

- **Principe:**

Une molécule chirale* comme les sucres possèdent la propriété de faire dévier le plan de polarisation d'une lumière polarisée et la détermination de ce pouvoir rotatoire se fait à l'aide d'un polarimètre (AFNOR, 1995).

- **Mode opératoire:**

- Allumer l'appareil et attendre 5 mn que la lampe soit chaude;
- Placer le blanc qui est de l'eau distillée dans le tube de polarimètre et étalonner l'appareil au point zéro;
- Remplacer l'eau distillée par la solution sucrée et lire la rotation.

Remarques:

- La solution à analyser doit être parfaitement limpide.
- Aucune bulle d'air ne doit se trouver sur le passage du faisceau de lumière.
- Rincer le tube de polarimètre avant chaque utilisation.

- **Expression des résultats:**

1^{ère} étape: Détermination de pouvoir spécifique de la solution sucrée par la loi de Biot:

$$\alpha = [\alpha]_{D}^{20} \times L \times C$$

Où: α : angle de déviation observé en degrés.

L : longueur de tube en dm.

C : concentration de la solution sucrée en g/ml.

$[\alpha]_{D}^{20}$: pouvoir rotatoire spécifique de la solution sucrée, mesuré à 20°C et à une longueur d'onde D.

D'après cette loi de Biot l'angle de déviation est proportionnel à la concentration de la solution.

2^{ème} étape: détermination de la concentration des sucres invertis dans la solution sucrée par la formule suivante:

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = a[\alpha]_{\text{DSac}}^{20} + b[\alpha]_{\text{Dglu}}^{20} + c[\alpha]_{\text{Dfru}}^{20}$$

Dont: $a + b + c = 1$.

Et: $b = c$.

Où:

$[\alpha]_{\text{DSac}}^{20}$ = pouvoir rotatoire spécifique du saccharose.

$[\alpha]_{\text{Dglu}}^{20}$ = pouvoir rotatoire spécifique du glucose.

$[\alpha]_{\text{Dfru}}^{20}$ = pouvoir rotatoire spécifique du fructose.

On constate que l'angle de déviation α diminue avec le temps jusqu'à -20°C : c'est l'inversion totale (AFNOR, 1995).

3.2. Inversion de l'extrait de datte variété sèche "Mech-Degla"

Préparation de l'extrait de datte :

Préparer un sirop de datte sèche "MECH-DEGLA", par la concentration sous vide de l'extrait de datte déjà préparé. Suivre par le réfractomètre la concentration jusqu'à obtenir la concentration souhaitée (Guerin et al., 1978).

La température de concentration ne doit pas dépasser 70°C .

Conditions de l'inversion :

- Peser 0.02% de biomasse séchée, pour 100 ml du sirop;
- Porter le mélange au bain-marie à 60°C pendant 9 heures;
- vérifier le pH.

3.2.1. Analyse quantitative des sucres du sirop après inversion:

La teneur en sucre réducteur de sirops après inversion est déterminée par la méthode de Fehling (Voir le protocole plus haut). Et la teneur en saccharose est déterminé par la formule suivante: % Saccharose = % Sucres totaux - % Sucres réducteurs.

3.2.2. Analyse qualitative des sucres par Chromatographie sur couche mince (CCM):

- **Principe:**

La chromatographie sur couche mince de type liquide/liquide, est une technique de séparation composée de deux phases, une phase stationnaire et une phase mobile.

La phase mobile est un solvant ou plusieurs solvants à l'état liquide, et la phase stationnaire est une couche mince et uniforme de gel de silice répandue sur un support (plaque) de plastique.

Les constituants de l'échantillon déposés ponctuellement sur la phase stationnaire (sur la plaque) vont être entraînés par la phase mobile qui migre par capillarité vers le haut de la plaque. Ils sont identifiés par comparaison à l'éluion simultanée de témoins (Multon, 1991).

- **Mode opératoire:**

- **Préparation des produits:**

- **Préparation du solvant:**

- 04 volumes de n- butanol;
 - 01 volume d'acide acétique;
 - 04 volumes de l'eau distillée.

- **Préparation de révélateur:** (juste avant l'utilisation).

- 50 ml de α -naphтол;
 - 01 volume d'éthanol;
 - 01 volume d'acide sulfurique.

- **Développement de la chromatographie:**

- Après avoir préparé la plaque de gel de silice, elle est placée dans la cuve à chromatographie contenant le système solvant.
 - Fermer la cuve par le couvercle et laisser migrer le solvant pendant 5 heures, jusqu'à ce que le fond du solvant atteigne presque le bord supérieur de la plaque (environ 2 cm du bord)

- **Révélation des spots:**

La plaque de chromatographie séchée et plongée dans une cuve contenant le révélateur, pendant 10 secondes, puis séchée jusqu'à l'apparition des taches sombres.

- **Expression des résultats:**

La position finale de la tache est une caractéristique de la molécule. Elle est exprimée en rapport frontal R_f ;

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

Chapitre 6 : Résultats et discussions

1. Compositions biochimiques de la datte variété sèche : « Mech-Degla »



Figure N°19 : Variété sèche : « Mech-Degla » utilisée.



Figure N°20 : Extrait de datte variété sèche : « Mech-Degla » utilisée.

Tous les résultats présents sont la moyenne de 6 répétitions. Les résultats relatifs à l'analyse biochimique de la pulpe de datte variété sèche utilisée: « Mech-Degla » dans notre étude sont présentés dans le **Tableau N°23** :

Tableau N°23 : Composition biochimique de la datte variété sèche :
« Mech-Degla »

Les composants.	La teneur (%) du poids frais	La teneur (%) du poids sec.
Teneur en eau	13,1 ± 0.35	-
Sucres totaux :	62,87 ± 0.65	72,35 ± 0.65
Sucres réducteurs	20,92 ± 0.30	24,08 ± 0.30
Saccharose	41,95 ± 0.25	48,27 ± 0.25
Protéines (6,25 x N%)	1,52 ± 0.05	1,75 ± 0.05
Cendre	1,73 ± 0.03	2 ± 0.03

1.1. Teneur en eau :

L'humidité nous permet de déterminer la teneur en matière sèche par rapport au poids totale, et d'exprimer les constituants biochimiques en % de la matière sèche. La teneur en eau de la datte utilisée dans notre expérience est de **13,1 % ± 0,35**, cette valeur est comparable à celle donnée par **Benflis (2006)**; **Noui (2007)** ; **Benamara et al. (2007)**, avec des teneurs de 13.1, de 14.15% et de 14,71%, cette faible teneur en eau permet une bonne conservation du produit pendant une longue durée.

1.2. Le pH :

Le pH de l'extrait de datte est légèrement acide, il est de **5,46 ± 0,07** Cette valeur est légèrement inférieure à celle donnée par : **Soltani (2007)** et **Noui (2007)**, avec des valeurs de **5,56** et de **6,14**. Il peut donc favoriser la multiplication des levures et moisissures et parallèlement freine le développement des bactéries à l'exception des acidophiles.

1.3. Teneur en sucres :

1.3.1. Teneur en sucres totaux :

L'extrait de datte utilisé dans notre expérience possède une teneur de **62,89 % ± 0,65** du poids frais, soit **72,35 % ± 0,65** du poids sec, ces valeurs sont obtenues par la méthode Dubois. Ces teneurs sont conformes aux résultats donnés par : **Soltani (2006)** et **Noui (2007)**, avec des valeurs de l'ordre de **70,66 %** et **79,75 %** du poids sec, et sont supérieures à celles données par **Benflis (2006)**, avec une teneur de 52,79 % du poids frais, soit 60,75 du poids sec.

Généralement, les valeurs trouvées montrent la richesse de la datte en sucres totaux, ce qui constitue un substrat favorable à la multiplication des levures.

1.3.2. Teneur en sucres réducteurs :

D'après le **Tableau N°12**, la teneur de la datte sèche : «Mech-Degla » en sucres réducteurs (glucose et fructose), déterminés par la méthode de Fehling, est de **20,92 %** du poids frais, soit **24,08 %** du poids sec. Cette teneur est conforme aux résultats donnés par plusieurs travaux : **Belguedj (2002)**, **Benflis (2006)** et **Soltani (2007)**, avec des valeurs de **16,64 %** à **20,92 %**.

1.3.3. Teneur en Saccharose :

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la datte sèche : « Mech-Degla », est riche en saccharose. En effet, les résultats obtenus par la formule sont est de **41,27 %** du poids frais et **48,27 %** du poids sec. Ce taux, est conforme aux résultats donnés par plusieurs travaux données par **Belguedj (2002)**, **Ersin et al. (2004)** et **Soltani (2007)**, avec des valeurs de **42 %** à **54,74 %** du poids sec. Selon **Dowson et Aten, (1963)**, les dattes molles sont caractérisées par un taux élevé en sucres réducteurs et les variétés sèches par un taux élevé en saccharose.

1.4. Teneur en protéines totales (azote Kjeldahl) :

La teneur en azote total est de l'ordre de **0,2 % ± 0,05** du poids frais, soit **0,28 %** du poids sec, pour évaluer le taux en protéine, nous avons utilisé le coefficient de conversion **6,25**, la teneur en protéines a été estimée à **1,57 g / 100g** de matière fraîche, soit de **1,75 %** du poids sec. Certains auteurs ont rapporté des teneurs en protéines relativement faibles, effet, **Al-Farsi et al., (2006)**, qui a trouvé des valeurs de 0,52 à 1,41 **g/100 g** du poids sec dans des variétés sèches; **Boudraa (2004)**, qui donne une valeur de 1,09 g/100g du poids frais.

1.5. Teneur en cendres totales :

Le taux des cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans l'échantillon. La teneur moyenne trouvée dans notre échantillon est de **1,73 % ± 0.03** du poids frais, soit **2% ± 0.03** du poids sec, nous pouvons dire que cette dernière est conforme à celle donnée par : **Yousif et al. (1982)**, **Belguedj (1996)** et **Noui (2007)**, avec des teneurs respectives de 1,92 % , **1,9 %** et **2 %** du poids sec. Cette valeur élevée explique la richesse de la variété Mech-Degla en éléments minéraux.

1.6. Teneur en éléments minéraux :

Les résultats des éléments minéraux que nous avons dosés dans notre échantillon sont mentionnés dans le **Tableau N° 24** :

Tableau N° 24 : Teneurs en éléments minéraux de la datte sèche : « Mech-Degla ».

Éléments minéraux.	Potassium	Sodium	Phosphore
Teneur en mg / 100 g du poids frais	780,01 ± 0.02	43,20 ± 0.03	64,86 ± 0.03
Teneur en mg / 100 g du poids sec	879,6 ± 0.02	49,72 ± 0.03	74,64 ± 0.03

Le potassium :

Comme le montre le **tableau N°13** : la teneur moyenne enregistrée en potassium est de l'ordre de **780,01 mg / 100 g ± 0.2** du poids frais, soit **879,64 mg /100 ± 0.02** du poids sec. Cette valeur est supérieure à celle résultats à celle donnée par : **Chibane et al.(2007)**, qui ont trouvé une valeur de **678 mg / 100 g** du poids sec de la datte sèche. Cette différence peut s'expliquer par l'influence des conditions climatiques.

Le sodium :

La teneur de la pulpe de datte en sodium est de l'ordre de **43,20 mg / 100 g ± 0.03** du poids frais, soit **49,72 mg / 100 g ± 0.03** du poids sec, valeur élevée par rapport à celle donnée par : **Chibane et al. (2007)**, qui rapportent une teneur de l'ordre de **34 mg / 100 g** du poids sec. Cette différence montre que la pulpe de datte que nous avons analysé est riche en sodium.

Notre résultat est important, mais inférieur aux variétés molles telle que : **Ghars** donnée par : **Kendri (1999)**, avec une valeur de l'ordre de **132,63 mg / 100 g** du poids sec.

Le phosphore :

La teneur en phosphore de la pulpe de datte dans notre expérience est de l'ordre de **64,86 mg / 100 g ± 0.03** du poids frais, soit **74,64 mg / 100 g ± 0.03** du poids sec. Cette valeur est conforme aux données bibliographiques, **Sawaya et al. (1982)**, avec une teneur de 71,1 – 76,7 **mg / 100 g** du poids sec.

Les résultats que nous avons obtenus montrent la richesse de la datte variété sèche : « Mech-Degla », en éléments minéraux (phosphore, potassium, et sodium), ces éléments minéraux sont utilisés par les levures lors de leur croissance au cours de la fermentation.

2. Isolement et identification de la souche *Saccharomyces cerevisiae* :

2.1. La fermentation alcoolique de l'extrait de dattes :

Après une semaine, une fermentation apparaît positive dans l'extrait de dattes N°5 (Tableau N°22) pasteurisé, l'odeur et l'apparition de mousse nous ont montré que c'est une fermentation alcoolique, ce qui indique la possibilité de la présence de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

2.2. Caractéristiques culturales :

Croissance sur milieu liquide : (milieu d'enrichissement)

L'examen des cultures après 24 heures d'incubation à 30°C a donné l'apparition d'un dépôt au fond des tubes, ce qui présente une culture positive.

FIGURE N°21 : Aspect culturale de *Saccharomyces cerevisiae* en milieu de base.



Croissance sur milieu solide :

- Milieu solide (Sabouraud) :

Après 48 heures d'incubation à 30°C, les aspects suivants des colonies ont été notés :

- 1- **Couleur** : crèmes, brillantes.
- 2- **Forme** : bombées et lisses.
- 3- Absence de pigmentation.

FIGURE N°22 : Aspect culturale de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu Sabouraud



- **Milieu solide (WLN)** : utilisé pour séparer *Saccharomyces cerevisiae* des souches sauvages

Les aspects des colonies sur WLN après 72 heures d'incubation à 25°C sont :

- 1- **Couleur** : vertes, brillantes.
- 2- **Forme** : rondes, lisses et bombées.

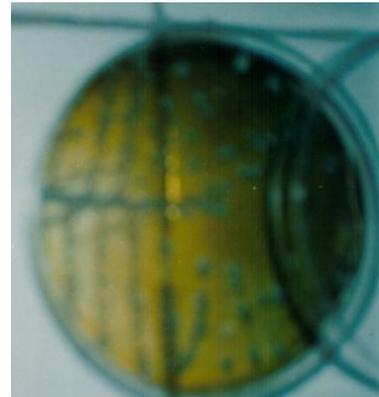


FIGURE N°23 : Aspect culturale de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu WLN

2.3. Caractéristiques morphologiques:

Après 24 heures d'incubation à 30°C sur milieu liquide (milieu d'enrichissement), les observations microscopiques effectuées sur les cultures en milieu liquide ont montré les aspects suivants :

Les cellules de la souche isolée à partir d'extrait de dattes sont de forme ovale à ronde. Cependant, quelques unes présentent sur des sites de leurs parois, des invaginations, ce qui indique le mode de reproduction végétative par bourgeonnement bipolaire.

Concernant le test de l'aptitude à la filamentation, les cellules de la souche observée au microscope après sept jours d'incubation se présentent groupées en plusieurs associations cellulaires sous forme de chaîne faisant aussi une structure filamenteuse, ce qui présente une structure pseudomycélienne.



FIGURE N°24 : Test de filamentation.

2.4. Caractéristiques physiologiques :

2.4.1. fermentation des sucres :

Les résultats des tests de fermentation des sucres montrent que la souche isolée à partir d'extrait de dattes variété « Mech-Degla » est incapable de fermenter le lactose et le xylose, ce qui peut présenter un trait de détection de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. En outre, notre souche fermente les mêmes sucres que ceux fermentés par *Saccharomyces cerevisiae*, comme l'indiquent **GUIRAUD ET GALZY, (1980)**.

Le **Tableau N°25**, mentionne les résultats de ce test.

Tableau N°25 : Test de fermentation des sucres de la souche isolée comparé à la souche de référence (commerciale).

Fermentation Sucres	Souche isolée	Souche de référence
Xylose(XY)	-	-
Lactose(LA)	-	-
Maltose(MA)	+	x
Glucose(GL)	+	+
Saccharose(SA)	+	+
Galactose(GA)	+	x

Fermentation négative (-)

fermentation positive (+)

variable (x)

2.4.2. Assimilation des substrats azotés :

Les résultats des tests d'assimilation des substrats azotés, réalisés sur quatre milieux enrichis en azote, montrent l'incapacité de notre souche isolée à partir d'extrait de dattes variété « Mech-Degla » d'utiliser les nitrates comme source d'azote, ce qui nous aide à identifier notre souche.

TABLEAU N°26 : Test d'assimilation des substrats azotes

Milieux	Résultats
Milieu 1 : Contenant les nitrates comme seule source d'azote (NI).	Pas de changement de couleur (pas d'assimilation d'azote).
Milieu 2 : Contenant l'urée comme seule source d'azote (UR).	Changement de couleur du bleu vert jaune transparent (assimilation d'azote).
Milieu 3 : Contenant l'urée et ammonium comme source d'azote (AM.UR).	Changement de couleur du bleu vert jaune transparent (assimilation d'azote).
Milieu 4 : Contenant l'ammonium comme seule source d'azote (AM).	Changement de couleur du bleu vert jaune transparent (assimilation d'azote).

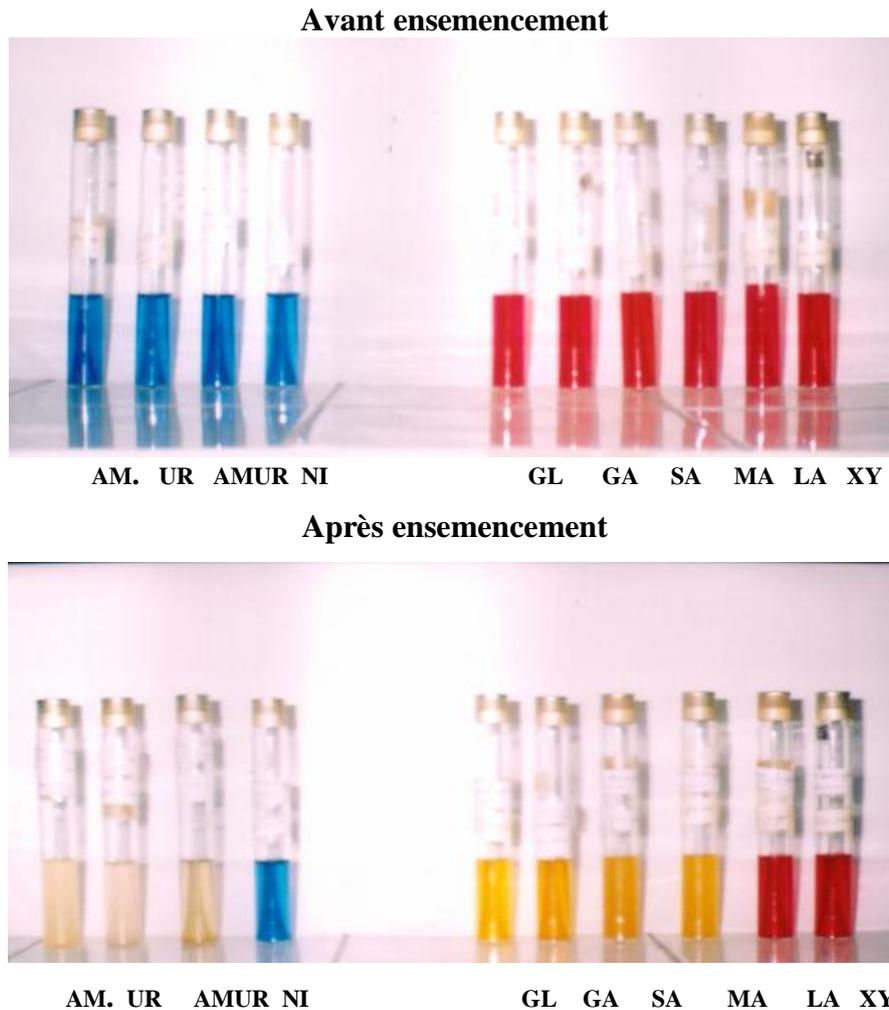


Figure N° 25 : Test des caractéristiques physiologiques

Conclusion :

L'identification de notre souche est basée d'abord sur la détermination du genre puis de l'espèce.

Détermination du genre :

La détermination du genre a été effectuée selon la clef dichotomique simplifiée proposée par **GUIRAUD et GALZY (1980)**. Cette clef est basée sur : L'examen microscopique d'une culture sur milieu ordinaire, les résultats du test de fermentation du glucose, lactose ainsi l'assimilation des nitrates.

Il en ressort que notre souche appartient au *Saccharomyces* en présentant les caractéristiques suivantes :

- Fermentation du glucose.
- Reproduction végétative par bourgeonnement bipolaire.
- Possibilité de formation d'un pseudomycélium.
- Lactose non fermenté.
- Nitrate non assimilé.

Détermination de l'espèce :

Nous avons utilisé une méthode basée sur un examen comparatif de certaines caractéristiques physiologiques de notre souche isolée par rapport à celle de la souche de référence *Saccharomyces cerevisiae*. Ces caractéristiques physiologiques sont effectuées dans notre laboratoire dans les mêmes conditions opératoires.

2.5. Aptitudes à la fermentation:

La cinétique de la croissance en " Batch " :

Dans cette étape, la croissance de la souche isolée et la souche commerciale est effectuée en milieu liquide non renouvelé dont le but est d'étudier les différentes phases de croissance et de déterminer le taux de croissance maximal des deux souches. La croissance est étudiée par la détermination de la densité optique, la matière fraîche et enfin le nombre cellulaire.



FIGURE N°26 : La biomasse de "*Saccharomyces cerevisiae*" isolée .

TABLEAU N°27 : Evolution de la concentration cellulaire en fonction du temps pour la souche "*Saccharomyces cerevisiae*" isolée (SI) et la souche commerciale (SC)

Temps (H)		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Log N	SI	5.70	5.70	5.73	5.76	5.91	6.04	6.16	6.28	6.44	6.59	6.74	6.90	7.08	7.27
	SC	5.48	5.48	5.51	5.51	5.58	5.64	5.67	5.82	60.1	6.13	6.31	6.47	6.68	6.80

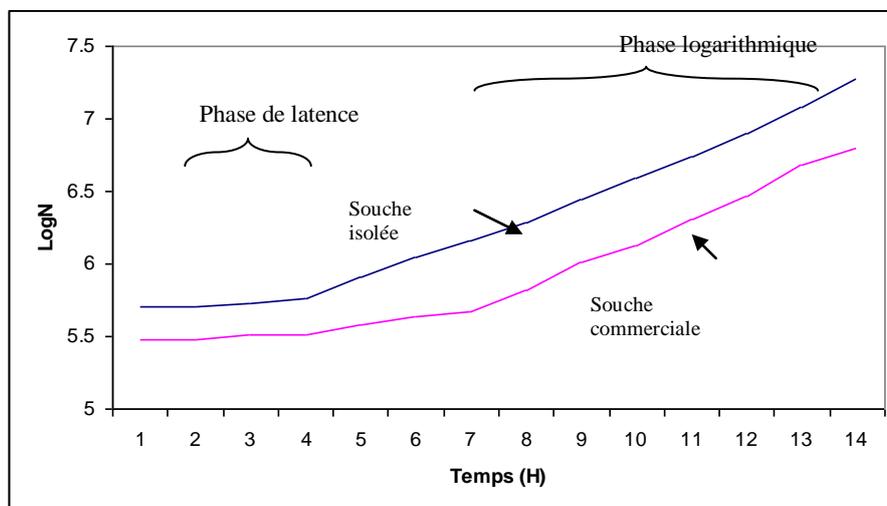


Figure N° 27 : Courbe de croissance de la levure "*Saccharomyces cerevisiae*" isolée et commerciale .

Comme mentionner sur la **Figure N°27**, le phénomène de la croissance cellulaire comporte plusieurs phases:

- **Phase de latence :**

Le temps de latence indique le degré d'adaptation des souches aux conditions de culture (milieu, pH, température), la durée de latence est indiquée graphiquement à partir des courbes de la densité optique en fonction du temps .

La **Figure N° 27** montre les courbes de croissance obtenues pour les deux souches: isolée et commerciale. Les résultats montrent que la durée de la phase de latence est 4 heures pour la souche isolée et 7 heures pour la souche commerciale, donc notre souche présente un temps de latence faible par rapport à celui de la souche commerciale.

D'après **Scriban (1993)**, le temps est lié directement à l'état physiologique et biochimique de la souche même. En effet, il s'agit de deux souches de levure provenant de milieu de culture de composition différente.

- **Phase logarithmique ou exponentielle :**

La phase exponentielle correspond à une multiplication cellulaire se faisant à vitesse constante. Elle peut être évaluée simplement par le temps de dédoublement et de la population microbienne (temps de génération), qui tout au long de la phase logarithmique prend sa valeur minimale, ou par la vitesse spécifique. Dans la **Figure N°28**, cette phase a l'allure d'une droite, durant laquelle la vitesse de la reproduction est constante.

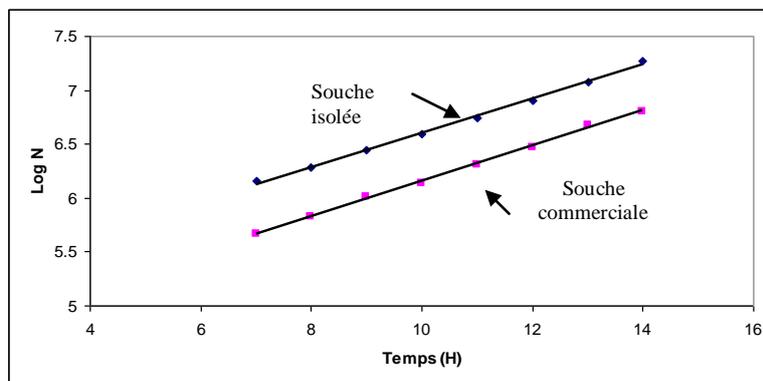


Figure N° 28: Taux de croissance des deux souches de levure (isolée et commerciale) .

Selon les résultats, les deux souches (souche isolée et souche commerciale) cultivées dans les mêmes conditions expérimentales présentent le même taux de croissance qui est 0.16 h^{-1} comparativement à ceux obtenus pour la même souche cultivée sur extrait de datte variété "Ghars" par **Massmoudi (2000)** qui est 0.15 h^{-1} , nos résultats sont importants, mais restent faibles par rapport à ceux trouvés par **Noui , (2001)** et **Abbaci, (2002)**, qui rapportent des taux de croissance de 0.39h^{-1} et 0.34h^{-1} respectivement pour les variétés molles "Tinissine et Ghars " . .

3. Etude de l'activité de l'invertase:

Selon **Linden (1981)**, la vitesse de réaction enzymatique, qui correspond à la pente de la courbe est maximale dans les premiers temps de la transformation, c'est la vitesse initiale. Puis cette vitesse décroît régulièrement et finalement s'annule lorsque tout le substrat, qui devrait être transformé, ait disparu.

On voit donc l'intérêt de mesurer la vitesse au début de réaction, lorsque peu de substrat a été transformé et de mesurer la quantité du produit à la fin de la réaction.

3.1. Etude de l'activité enzymatique dans une solution de saccharose à 50%:

Tableau: 28 : Suivi de l'activité enzymatique de la biomasse dans une solution de saccharose à 50 %

Temps	0	1 ^{ère} heure en minutes						
		10	20	30	40	50	60	
concentration des sucres invertis en % du Saccharose	0	16.92	21.45	30.72	33.05	37.69	43.48	
Temps	Heure							
	2	3	4	5	6	7	8	9
concentration des sucres invertis en % du Saccharose	45.80	51.60	54.05	56.24	58.55	59.72	66.67	66.67

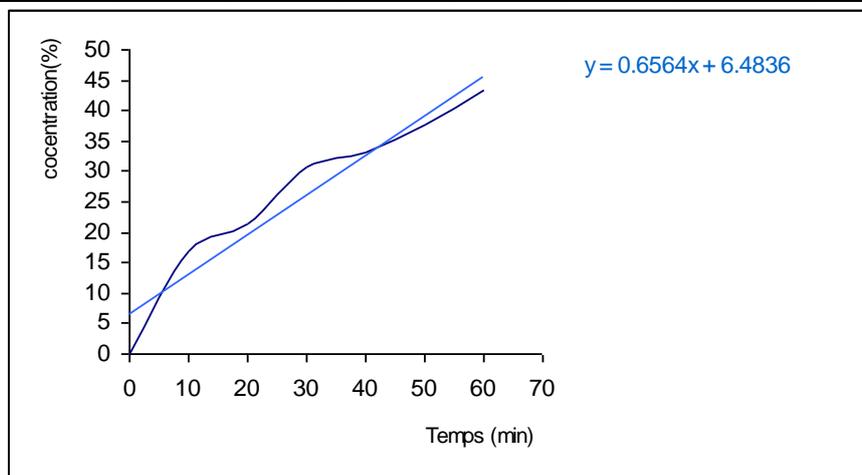


Figure N°29 : Suivi de l'activité enzymatique de la biomasse (invertase) dans la première heure.

D'après l'équation de la courbe ci-dessus Figure N°29, nous constatons que:

- La vitesse de la réaction qui représente graphiquement la pente de la courbe est égale à 0.65 g/min.
- Lors des premières dix minutes, 16.92 % des sucres invertis sont formés sous l'effet de l'invertase sur le saccharose de la solution.
- En une 60 minutes, 43.48 % des sucres invertis sont formés sous l'action de l'invertase sur le saccharose.

Ces résultats sont conformes aux données bibliographiques (**Guerin et al., 1978**), où 50 % des sucres invertis sont formés sous l'action de l'invertase sur le saccharose pendant un temps très court (une heure). Il sont conformes aussi aux résultats de **Sahraoui (2003)** et **Bacha et al. (2007)** avec des pourcentages respectifs de 48.01 % et 5.3 % des sucres invertis formés durant une heure, sous l'action de l'invertase produite par *S.cerevisiea* isolée d'un milieu à base d'extrait de datte molle "GHARS".

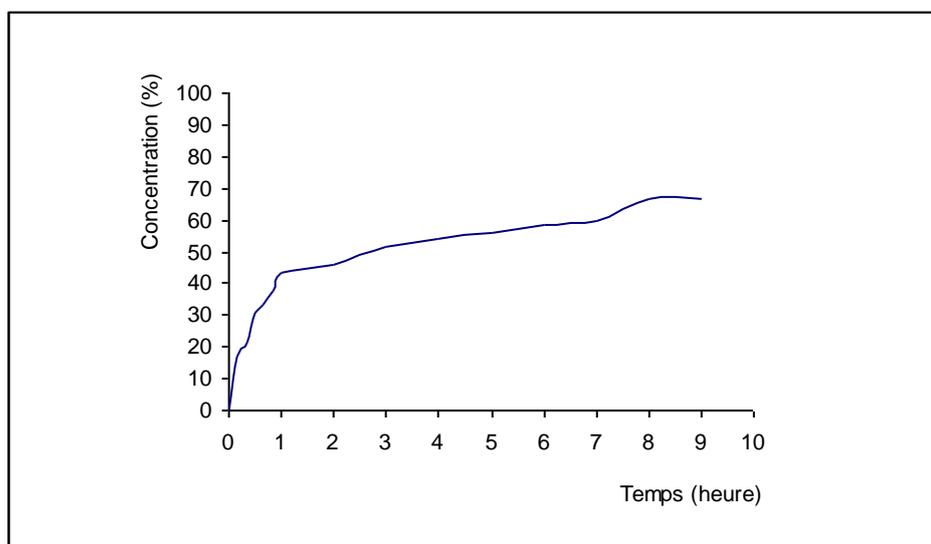


Figure N°30: Suivie de l'activité enzymatique de la biomasse (invertase) en fonction du temps

D'après la courbe ci-dessus, nous constatons que:

- A la fin de la réaction, 66.67 % des sucres invertis sont formés sous l'action de l'invertase sur le saccharose.
- De la 1^{ère} heure à la 8^{ème} heure, 23.19% des sucres invertis sont formés sous l'action de l'invertase sur le saccharose.

Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux obtenus par **Sahraoui (2003)**, avec une valeur de 31,9 % des sucres invertis formés pendant 7 heures sous l'action de l'invertase produite par la levure *S. cerevisiea* isolée d'un milieu à base d'extrait de datte molle "Ghars". Nos résultats sont dus dûs à la richesse de la datte sèche "Mech-Degla" en saccharose (40.78 % des sucres totaux) par rapport à la datte molle "Ghars" en saccharose (7 % des sucres totaux), qui constitue l'inducteur de l'invertase. **Bacha et al., (2007)**, ont rapporté qu'après une heure, 61 % du saccharose est inversé (1 g/min). Au-delà d'une heure l'inversion du saccharose est ralentie. Au bout de 10 heures, 82,3 % de sucres invertis sont formés.

Gilbert et Pierre (1988), ont montré que l'allure de la courbe est le résultat d'une relation directe entre la diminution de l'efficacité de l'invertase et les modifications de structure que subit la molécule de saccharose en solution concentrée par suite d'établissement de liaisons intra et intermoléculaires, qui sont liées directement à l'activité de l'eau libre dans le milieu, rendant ainsi le substrat moins disponible pour l'invertase. Dans le même contexte, **Ergov et al. (2000)** ; **Baig et al., (2003)**, ont montré que la concentration élevées de sucres invertis dans le milieu de culture réduisent l'activité de l'invertase.

3.2. Etude de l'activité enzymatique dans l'extrait de datte sèche "Mech-Degla"

3.2.1. Analyse quantitative des sucres de l'extrait après inversion:

Tableau N° 29 : Inversion du saccharose dans l'extrait de datte par la biomasse
(en % des sucres totaux).

	Avant inversion	Après inversion
Sucres invertis, en % des sucres totaux	27,00	53.21
Saccharose en % des sucres totaux	40.78	26.21
Saccharose inversé, en %	64.27	

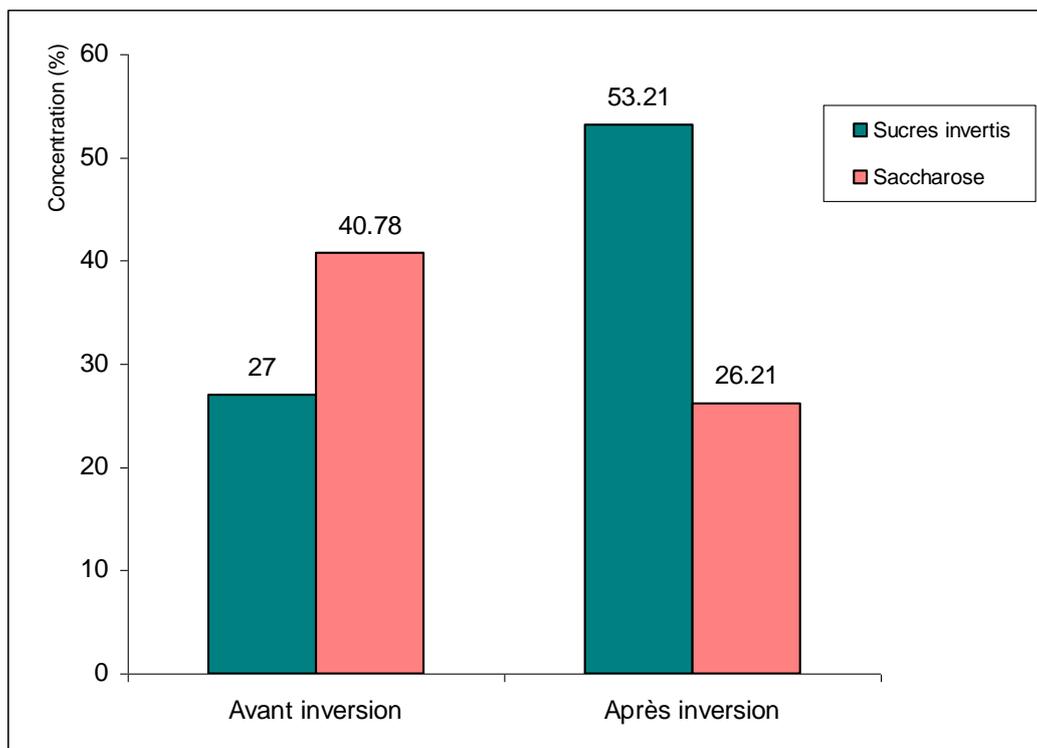


Figure N° 31: Quantité de sucres invertis sous l'action de l'invertase dans l'extrait de datte "Mech-Degla"

D'après le **Tableau N°29** et la **Figure N°31**, nous constatons que la quantité des sucres invertis est de 27 % des sucres totaux avant l'inversion, elle augmente à 53.21 % des sucres totaux après inversion (10 heures). Ceci est la conséquence de l'effet de l'invertase sur le saccharose existant dans l'extrait. Ce qui correspond à 64.27 % de saccharose initial est inversé.

3.2.2. Analyse qualitative des sucres par chromatographie sur couche mince:

Pour confirmer les résultats précédents nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince (gel de silice), la **Figure N°32** montre les différents sucres de l'extrait de datte après inversion.



Figure N°32 : Chromatographie des sucres de la datte sèche avant et après inversion

Tableau N°30 : Résultats de la chromatographie sur couche mince (gel de silice) des sucres de datte sèche avant et après l’inversion par l’invertase

	Témoins			Extrait				Saccharose		
	Saccharose	fructose	glucose	avant inversion			après inversion		après inversion	
				Tache1	Tache2	Tache3	Tache1	Tache2	Tache1	Tache2
Rf	0.22	0.41	0.27	0.23	0.44	0.29	0.24	0.42	0.23	0.45

D’après la **Figure N° 32** et **Tableau N°30** , nous constatons que :

L'extrait de datte, avant inversion contient trois types des sucres :

- Le glucose, le fructose (sucres invertis) et le saccharose avec une grande proportion (par rapport aux sucres invertis);
- L'extrait après inversion contient une faible quantité de saccharose avec une grand quantité de sucre invertis(fructose).

CONCLUSION GENERALE

L'exploitation des systèmes micro-organisme/substrats intéresse actuellement la recherche, en vue d'obtention d'un produit facilement séparable du milieu. Pour cette raison, nous avons essayé d'isoler une souche de levure «*Saccharomyces cerevisiae* » à partir d'extrait de dattes variété « Mech-Degla » et la détermination de certaines de ses caractéristiques.

Les résultats les plus intéressants au terme de ce travail sont :

- L'analyse biochimique de l'extrait de datte variété sèche « Mech –Degla » montre sa richesse en sucres fermentescibles (saccharose, glucose et fructose). Ces sucres sont utilisés par la levure comme substrat organique pour la production de biomasse.
- Isolement et identification de la souche recherchée à partir de son milieu naturel (extrait de datte).
- La bonne adaptation dès le début de la culture dans son milieu naturel (d'isolement) avec un temps de latence court (4 heures) comparé à la souche de référence (commerciale).
- La bonne croissance due à l'enrichissement du milieu par l'addition de sources azotées indispensables à la croissance (taux de croissance: 0.16 H^{-1}).
- Une activité élevée de l'invertase due à la richesse des dattes variété Mech-Degla en saccharose (Vitesse d'inversion: $0,65 \text{ g/min}$).

Enfin, nous espérons une application de cette technique à l'échelle industrielle pour la production de l'invertase et donner ainsi au système levure-datte une forte valeur ajoutée.

Nous estimons intéressant d'approfondir et de perfectionner ce travail en le réalisant dans des conditions meilleures par l'étude de certains paramètres tels que:

- L'optimisation de la production de biomasse « *Saccharomyces cerevisiae* » à partir d'extrait de dattes variété "Mech-Degla".
- Les caractéristiques biochimiques de la biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" cultivée sur un substrat d'extrait de dattes (Mech-Degla).
- L'influence des différentes techniques de séchage sur l'activité de cette enzyme produite par la levure "*Saccharomyces cerevisiae*" à base d'extrait de datte «Mech- Degla».

Abbaci s., 2002. Isolement et Identification d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* à partir d'extrait de datte variété "Ghars". Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 64 p.

Abdelfateh K., 1988. Quelques aspects de l'économie dattière en Tunisie. Communication "Les systèmes agricoles oasisiens". Les cahiers de la recherche développement, N°22, p 44-56

Acourene S., Tama M., 1997. Caractérisation physico-chimique des principaux cultivars de dattes de la région de Ziban. Revue de recherche Agronomique N°1, p: 59– 66.

Adrian J., Legrand G., Fragne R., 1981. Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition. Ed. Tec & Doc. Paris, 233 p.

AFNOR, 1995 Contrôle de la qualité des produits alimentaires Méthodes d'analyses officielles. Tome I: Boissons alcoolisées, sucres, miels, ovoproduits, produits diététiques, aliment surgelés, additifs alimentaires. Ed. AFNOR - Tour Europe. Cedex, pp 355- 406

Aït-Ameur, 2001. Analyse du processus de diffusion des sucres, des acides organiques et de l'acide ascorbique dans le système : Mech-Degla/Jus de citron. Mémoire de magister. Département de technologie alimentaire. Université de Boumerdes, 80 p.

Alais C., Linden G., 1992. Abrégés de biochimie alimentaire. (Ed) Masson .Paris, 150p.

Al-Farsi M., MorisA., Baron M., 2006. Functional Proprietes of dates (*Phoenix dactylifera*). Acta Horticultrae 736, P: 479-484.

Audigié D., Dupont G., Zonszain T., 1978. Manipulation d'analyse biochimique. Ed. Doin. Paris, p: 27 – 74.

Bacha A., Alloui-Lombarkia O., Abdeddaim M., Ghennam E-H., 2007. Added Value for Date Extracts by Invertase Production. Acta Horticultrae 736, P: 531-536.

Baduel P., 2002. Fermentation et principales applications alimentaires. Techniques de l'ingénieurs, 3240p.

Baig M-A., Shafiq K., Ali S., Haq I., 2003. Effect of urea as inducer of β -fructofuranosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. Pakistan J.Nutr. 2: 106-108.

Bauer W., Raetz E., 1992. Fermentation et Technologie enzymatique. Lausanne, 62 p.

Belguedj M., 1996. Caractéristiques des cultivars de dattiers du Sud-Est du Sahara algérien. Vol I. Conception et réalisation : Filière "Cultures pérennes" de l'ITDAS, 67 p.

Belguedj M., 2002. Caractéristiques des cultivars de dattiers dans les palmeraies sud-Est Algériens. Ed. Dossier– Document - Débat, 289p.

Benamara S., Chibane H., Boukhelifa M., 2004. Essai de formulation d'un yaourt naturel aux dattes. Industries Alimentaires et Agricoles IAA. Actualités techniques et scientifiques, p11-14.

Benamara S., Gougam H., Amellal H., Djouab A., Benahmed A., Noui Y., 2007. Some Technologic Proprieties of Commun date (*Phoenix dactylifera L.*) Fruits. American Journal of Food Technologie, 8: 1557-4571

Benattia A., 1990. Valorisation des rebus de dattes, composition chimique de digestibilité in vitro. Mémoire d'ingénieur, Institut d'Agronomie, Batna, 50 P

Benbrahim M., 2001. L'optimisation de la production de biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" à partir d'un extrait de datte d'une faible valeur marchande (TINISINE). Mémoire d'ingénieur. Institut d'agronomie. Batna, 36p.

Benflis S., 2006. Caractéristiques biochimiques de l'extrait de datte variété sèche "Mech-Degla". Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 50 p.

Bimbenet J., Duquenoy A., Trystram G., 2002. Génie des procédés alimentaires des bases aux applications. (Ed) Dunod. Paris, pp390-393.

Botton B et al, 1990, Biotechnologie (moisissures utiles et nuisibles) importance industrielle. Ed. Masson, Paris, 511 p

Boudraa S., 2004. La production de biomasse *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu a base d'extrait de datte variété sèche : « Mech-Degla ». Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 70 p.

Boughnou N., 1988. Essai de production de vinaigre à partir de déchets de dattes. Mémoire de Magister. Institut National d'Agronomie - EL – Harrach, 82 p.

Bouhadja C., Nizeymana G., 1992. Contribution à l'étude de l'effet de la température de conservation sur la viabilité de la levure fraîche de boulangerie produite à l'ERIAD-BOUCHAGOUF. Mémoire d'Ingénieur, INATAA. Université de Constantine 46 P

Bouix M., Leveau J.Y., 1993. Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Technique et documentation-Lavoisier-Apiaria. Paris, 523 P

Bourat G., 1992. Propriétés des micro-organismes, traité génie des procédés. Journal de technique de l'ingénieur, PARIS. Volume 6.

Bourgeois C. M., Larpent J., 1996. Microbiologie alimentaire. Vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire. (Ed) Lavoisier. Paris, 523 p.

Bourgeois C. M., Leveau J. Y., 1991. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol.III: le contrôle microbiologique. (Ed) Lavoisier. Paris, 451p.

Callon C., 1997. Les levures. In Larpent J-P. Microbiologie alimentaire Technique de Laboratoire. Technique et Documentation. Paris, pp472-564.

Camonis J.H., 1990. Modulation de l'activité des protéines RAS et régulation du cycle de division cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire doctort. Paris, 196 p

Cheftel J., Cheftel C., 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Vol I, 4 ème tirage. Ed. Technique et Documentation, Paris, 367 p.

Cheftel H., Cheftel J. C., 1978. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments vol I. Ed. Technique et Documentation. Paris, 381 p.

Chibane H., Benamara S., Noui Y., Djouab A., 2007. Some Physicochemical and Morphological Characterizations of Three Varieties of Algerian Common Dates. European Journal of Scientific Research. 18 (1): 134-140

Darkaoui F., 1985. Essai de valorisation des rebuts de datte par voie biologique. Mémoire d'Ingénieur. Institut National d'Agronomie. El – Harrach, 88p.

Didier P., 1996. Travaux pratiques de biologie des levures. Ellipses. Paris.

Djerbi M., 1994. Précis de phoeniciculture. FAO, 192 p.

Dowson H. W., Aten A., 1963. Récolte et conditionnement des dattes. Ed. FAO. Rome, 398 p.

Egorov S-N, Semenova I-N., Maksimov V-N., 2000. Mutuel effect of invertase and phosphatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on their secretion into culture media. Mikrobiologia; 69:34-37.

Erskin W., Moustafa A-T., Osman A-E., Lashine Z., Nejatian A., Badawi T., Ragy S-M., 2004. Date Palm in the GCC countries of the Arabian Peninsula Workshop on Date Palm Development in the Arabian Peninsula. 29-31 may –ICARDA-UAEU.

Espiard E., 2002. Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris. pp 147-155.

Estanove P., 1990. Note technique : Valorisation de la datte. In Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318.

FAO, 2003. Agro-statistics. Database. Rome.

Foura S., 1980. Contribution à l'étude chimique des dattes en Algérie. Mémoire d'Ingénieur. I.N.A.T.A. Constantine, 71 p.

Gaillard J. L., Leclerc H., Simonet M., 1995. Microbiologie générale. (Ed) Doin. Paris, 535p

Gerard R., 1973. Yes technology baker yeast. The AVI publishing company IMC. USA.

Gilbert D., Pierre M., 1988. Les enzymes, production et utilisation industrielles. (Ed) Gauthier Villars, France, 107 p.

Gilles P., 2000. Cultiver le palmier dattier. Ed. CIRAS, 110 p.

Guattieri M., Rapaccini S., 1994. Date stones in broiler's feeding. In Technologie de la datte. Ed. GRIDAO, 35 p.

Guerin B., Gauthier A., Ortlieb J., 1978. Les sirops (saccharose, glucose, fructose et autres édulcorants) valeur technologique et utilisation. (Ed) Technologie et Documentation. Cedex, 107 p.

Guiraud J., Galzy P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. les éditeurs de l'Usine Nouvelle. Paris .236 P.

Guiraud J., Galzy P., 1998. Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. Paris. 615 P.

Haq I., Shafiq K., Ali S., Qadeer M-A., 2002. Production of enzyme invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Indus. J. Plant Sci.* 55-60.

Hanachi S., Khitri D., Benkhalifa A., Brac de Perrière R.A., 1998. Inventaire variétal de la palmeraie algérienne. 225 p.

I.T.D.A.S., 2001. Statistiques agricoles (Station expérimentale de Ain-Bennoui, Biskra).

Javillier M., Polonovski M., Florkin M., 1964. Traité de biochimie générale. Tome II : Les agents des synthèses et des dégradations biochimiques : Les enzymes. (Ed) Masson. Paris ,570p.

Kendri S., 1999. Caractéristiques biochimiques de la biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" produite à partir des dattes " Variété Ghars ". Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie. Université de Batna, 51 p.

Khnessa A., Ziani R., 1991. Essai de production des protéines par les levures à partir des dattes comme substrat et possibilité de leur utilisation dans l'alimentation du poulet de chair. Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 44 p.

Larpent J. P., Gourgoud M., 1985. Elément de microbiologie. Ed.Herman. Paris, 464p.

Larpent J. P., 1991. Biotechnologie des levures. Ed. Masson. Paris, 426 p.

Larpent J. P., 1992. La microbiologie de la fermentation panaière. (Ed) Technologie et documentation. Cedex, 51 p.

Larreta G., 1997. Enzymes en agro-alimentaire. (Ed) Technologie et documentation agro-alimentaires. Paris, 375 p.

Laurent L., 1991. Eléments minéraux. In: Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Vol 4. Ed. Lavoisier. Paris, pp : 79-79.

Lavollay J., 1968. Progrès en chimie agricole et alimentaire. Ed. Mosson, Paris, 115 p.

Lecoq R., 1965. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Tome I. Ed. DOIN, DEREN et CIE, pp 241-251.

Leclerc H., Buttiaux R., Guillaume J., Wattre P., 1977. Microbiologie appliquée. Ed. Doin, Paris , pp168-188.

Linden G., 1981. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Vol. II: Principe des techniques d'analyse. (Ed) Collection Science et Technique Agroalimentaire. Paris, 434 p.

Linden G., Lorient D., 1994. Biochimie agro-industrielle. (Ed) Masson. Barcelone, Milan, Paris, 148 p.

Maatallah S., 1970. Contribution à la valorisation de la datte algérienne. Mémoire d'Ingénieur. Institut National d'Agronomie. El-Harrach, 77 p.

Masmoudi N., 2000. Essai de production de biomasse "*Saccharomyces cerevisiae*" à partir des dattes "Ghars". Mémoire d'Ingénieur. Département d'agronomie. Batna, 52 p

Matallah M.A.A., 2004. Contribution à l'étude de la conservation des dates variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieur, Institut National d'Agronomie. El-Harrach, 79 p.

Mazoyer M., 2002. Larousse agricole, le monde agricole au XXI ème siècle. Ed. MATHILDE MAJOREL, 224 p.

Michèle M., Frederic R., 2000. Lyophilisation. Journal : Technique de l'ingénieur, Traité Agroalimentaire, 3210p.

Moukil B., 1982. Identification de ceux souches de levure isolées de la mélasse et de nèfles. Mémoire d'Ingénieur. Institut National d'Agronomie., El-harach, 34 P

Multon J.L., 1991. Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Tome II: Analyse des constituants alimentaires. Ed. Lavoisier. Paris, 450 p.

Munier P., 1973. Le palmier dattier. Ed. MAISONNEUVE, Paris, 221 p.

Navarr J., 1974. Manuel d'œnologie (2^{ème} édition), Bailliere. Paris, 218 p.

Noui Y., 2001. L'optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur un extrait de datte. Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Université de Batna, 62 p.

Noui Y., 2007. Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister. Option : Technologie Alimentaire, Université de Boumerdes. 60 P.

Oteng-Gyang K., 1984. Introduction à la microbiologie ans les pays chauds. Ed. Lavoisier. Paris. Pp: 43-46.

Ould El Hadj M.D., Sebihi A.H., Siboukeur O., 2001. Qualité Hygiénique et Caractéristique Physico-Chimique du Vinaigre Traditionnel de Quelques Variétés de Dattes de la Cuvette de Ouargla. Rev. Energ. Ren : Production et Valorisation-Biomasse, pp 87-92

Ourlis T., 2002. Contribution à l'étude de quelques caractéristiques morphologiques et biochimiques du fruit de quelques cultivars de palmier dattier "*Phoenix dactylifera*" dans la région de Sidi Okba (Biskra). Mémoire d'ingénieur. Département d'Agronomie. Batna, 73 p.

Pelmont J., 1993. Enzyme. (Ed) Office des Publications Universitaires. Alger, 599 p.

Peyront G., 2000. Cultiver le palmier-dattier. (Ed) Groupe de recherche et d'information. Paris, pp19-22.

Planche B., 1980. La lyophilisation dans les industries alimentaires. (Ed) centre technique de l'E.N.S.A.J.A. Paris,

Razi M., 1993. Contribution à l'étude de la valeur nutritive du jus de datte de quatre variétés molles (Ghars, Itma, Tanslit et Takermoust) en comparaison avec le miel d'abeille. Mémoire d'Ingénieur, I.T.A.S. Ouargla, 66 p.

Revuz B., 1979. Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur mélasse). (Ed) Lavoisier. Paris, pp 113-120.

Reviere J., 1975. Les applications industrielles de la microbiologie. Ed. Masson, 129 p.

Sahraoui C., 2003. L'influence de la composition du milieu de culture sur l'activité de l'invertase produite par *S. cerevisiae* . Mémoire d'Ingénieur. Département d'Agronomie. Batna, 30 p.

Saouli N., 2005. Le potentiel phoenicicole algérien. Journées d'étude sur la transformation des produits du palmier dattier, I.T.D.A.S. Biskra.

Sawaya W.N., Khtchadourian H.A., Khalil J.K., Safi W.M., Al-Shalat A., 1982. Growth and Compositional Changes During the Various Developmental Stages of Some Saudi Arabian Date Cultivars. Journal of Food Science, 47: 1489-1497.

Scriban R., 1993. Biotechnologie. (4^{ème} Ed) Technologie et documentation - Lavoisier. Paris, 886 p.

Scriban R., 1999. Biotechnologie. (5^{ème} Ed) Technologie et documentation - Lavoisier. Paris, 1017 p.

Simon R., Meunier P., 1970. Microbiologie industrielle et Génie biochimique. (Ed) Masson et Cie. Paris, 559 p.

Soltani H., 2007. Etude comparative de la composition biochimique de trois types d'extrait de dattes: Datte molle "Ghars", Demi-molle "Deglet-Nour" et Sèche "MecDegla". Mémoire d'Ingénieur. Département d'Agronomie. Batna, 57 p.

Staron T., 1977. Les protéines non conventionnelles pour l'alimentation humaine dans la communauté économique Européenne .ed. Apria, Paris. 559 P

Tabib R., 1999. Contribution à l'étude de quelques caractéristiques morphologiques et pomologiques du fruit de quelques cultivars de palmier dattier "*Phoenix dactylifera*" dans la région de M'caonneche. Mémoire d'Ingénieur. Institut d'Agronomie. Batna, 67 p.

Thuriaux P., 2004. Les organismes modèles : "la levure" .Ed. DECLIN. Paris. 1-144 P

Tortora G.J., Anagnostakos, N.P., 1987. Principes d'anatomie et de physiologie. Ed. INC, 5^{ème} édition, pp 688-693.

Toutain G., 1977. Eléments d'agronomie saharienne : de la recherche au développement. Ed. JOUVE, Paris, 276 p.

Toutain G., 1979. Elément d'agronomie saharien. Ed. Jaune. Paris, 276 p.

Toutain G., 1996. Rapport synthèse de l'atelier "Techniques culturelles du palmier dattier". In Options méditerranéennes, série, N° 28. Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain, pp 201-205.

Touzi A., 1996. Essai de la croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* avec substitution de la source d'azote produit en Algérie. Mémoire d'ingénieur I.N.A.T.A. Constantine 90 p.

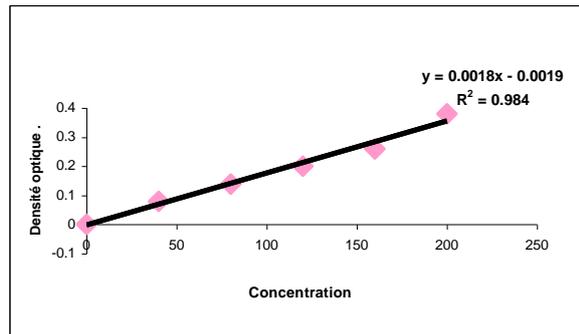
Touzi A., 2005. Production des substances à forte valeur ajoutée à partir des produits de la palmerie algérienne. I.T.D.A.S. Biskra.

Youssif A-K., Benjamin N-D., Kado A., Alddin S-M., Ali S-M., 1982. Chemical Composition of four Iraqi Date Cultivars. Date Palm Journal. 1(2) : 285-294.

ANNEXE

1- Gamme étalon de Glucose à 0,01% pour les sucres totaux (Méthode Dubois).

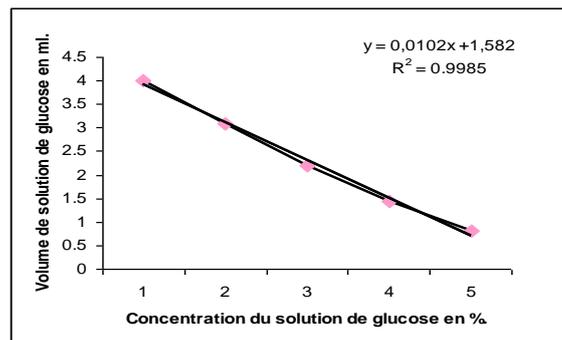
Quantité de glucose en ml	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Eau distillée en ml	2	1,6	1,2	0,8	0,4	0
Concentration en $\mu\text{g/ml}$.	0	40	80	120	160	200
Densité optique.	0	0,08	0,14	0,20	0,26	0,38



Courbe étalon du glucose à 0,01 %

2- Gamme étalon du glucose 5% pour les sucres réducteurs (Méthode de Fehling).

Concentration de la solution du Glucose en %.	1%	3%	6%	9%	12%
Volume de solution de glucose en ml	4	2	1,2	1	0,8



Courbe étalon du glucose à 5%

Le mode de préparation des solutions de Fehling :

- **Solution de Fehling A :**
 - CuSO_4 40 g/l.
 - H_2SO_4 : 05 ml.
 - Eau distillée : 100ml.
- **Solution de Fehling B :**
 - Tartrate double de Na et de K..... 200g / l.
 - NaOH : 150 ml
 - Eau distillée.

3- Détermination des minéraux :

Les 3 principaux minéraux déterminés sont : **le K, Na, P.**

Dosage du potassium :

Réactifs :

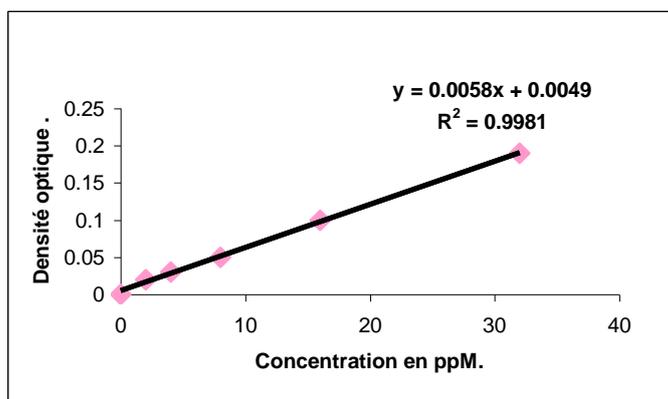
- Solution mère de potassium à **1000 ppm** (préparée à partir de KCL préalablement calciné à **500° C** .Dissoudre **1,9066 g** de **KCL** dans un litre d'eau distillée).
- Solution de potassium à **100 ppm** : dilution de la solution mère **10 fois**.

Préparation de la gamme étalon :

A partir de solution fille (**100 ppm**), on prépare la gamme étalon comme l'indique le tableau :

Gamme étalon du potassium.

N° du tube	Témoin	1	2	3	4	5
Solution de potassium (100 ppm)	0	2	4	8	16	32
Eau distillée (ml).	Compléter à 100 ml					
Concentration (ppm)	0	2	4	8	16	32
Densité optique à 766,5 nm	0	0,02	0,03	0,05	0,1	0,19



Courbe étalon du potassium.

Expression des résultats :

La teneur en potassium en **mg / 100 g** de matière sèche est donnée par la formule suivante :

$$K\% = \frac{X \times U \times V}{10^4 \times P} \times 100$$

Soit :

K% : Exprimée en **mg /100 g** de poids sec ; **U** : Le nombre de dilution (**25 fois**) ;

V : Volume de la solution minéralisée (**20 ml**) ; **P** : Le poids de la matière sèche en (**g**) ;

X : La concentration calculée à partir de l'équation lue sur le graphe.

Dosage du sodium :

Réactifs :

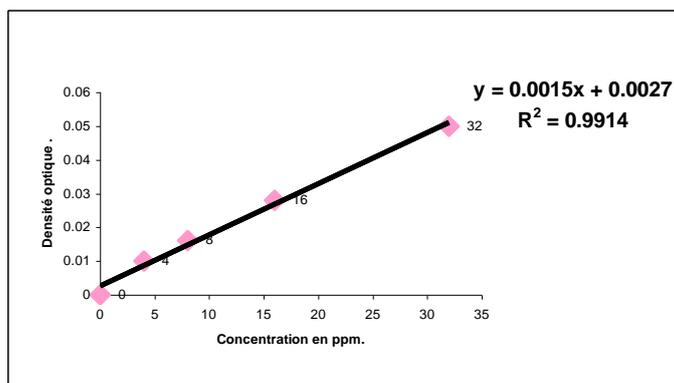
- Solution mère de sodium à **1000 ppm** (préparée à partir de NaCl préalablement calciné à **550°C**. Dissoudre **2,5434 g** de NaCl dans un litre d'eau distillée) ;
- Solution de sodium à **100 ppm** : dilution de la solution mère **10 fois**.

Préparation de la gamme étalon :

A partir de la solution fille (**100 ppm**), on prépare la gamme étalon comme l'indique le tableau :

Gamme étalon du sodium

N° du tube	Témoin	1	2	3	4
Solution de sodium (100 ppm)	0	4	8	16	32
Eau distillée (ml).	Compléter à 100 ml				
Concentration (ppm)	0	4	8	16	32
Densité optique à 590 nm	0	0,01	0,016	0,028	0,05



Courbe étalon de sodium

Expression des résultats :

La teneur en potassium en **mg / 100 g** de matière sèche est donnée par la formule suivante :

$$Na\% = \frac{X \times U \times V}{10^4 \times P} \times 100$$

Soit :

Na% : Exprimée en **mg / 100 g** de poids sec ; **U** : Le nombre de dilution (**25 fois**) ;

V : Volume de la solution minéralisée (**20 ml**) ;

X : La concentration calculée à partir de l'équation lue sur le graphe ;

P : Le poids de la matière sèche en (**g**).

Dosage du phosphore :

Réactifs :

Solution de KH_2PO_4 .

Acide ascorbique 0,1 %.

Réactif sulfomolybdique.

Mode Opérateur :

Prélever **1,5 ml** de la solution à doser et mére dans un tube à essai ;
 Ajouter **6,5ml** d'acide ascorbique à **0,1%** ;
 Ajouter 2 ml de la solution de réactif sulfumolybdique ;
 Mettre les tubes à essai dans un bain-marie pendant **10 mn** ;
 Refroidir les échantillons.

Préparation de la gamme étalon :

A partir de la solution fille (100 ppm), on porte la gamme étalon comme l'indique le tableau :

La gamme étalon du phosphore.

N° du tube	Témoin	1	2	3	4	5
Solution KH ₂ PO ₄ (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Eau distillée (ml).	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Réactif sulfumolybdique (ml).	2	2	2	2	2	2
Acide Ascorbique (ml).	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6
Concentration finale (ml).	0	0,5	1	1,5	2	2,5
Densité optique à 650 nm	0	0,19	0,39	0,63	0,74	0,99

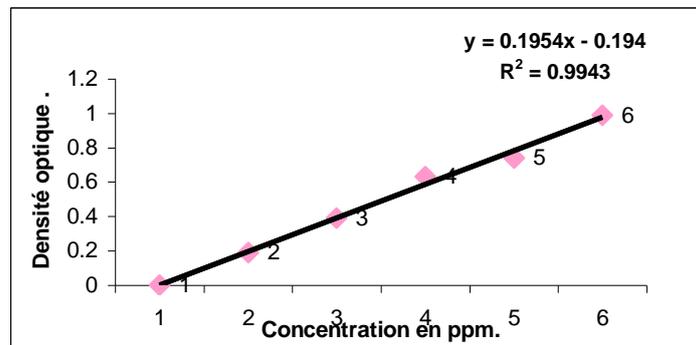


Figure N°23 : Courbe étalon du phosphore

• **Expression des résultats :**

La teneur en phosphore en **mg / 100 g** de matière sèche est obtenu par la formue suivant :

$$P\% = \frac{X \times U \times V}{10^4 \times P} \times 100$$

Soit :

- P%**: Exprimée en **mg /100 g** de poids sec ;
- U** : Le nombre de dilution (**25 fois**) ;
- V** : Volume de la solution minéralisée (**20 ml**) ;
- X** : La concentration calculée à partir de l'équation lue sur le graphe ;
- P** : Le poids de la matière sèche en (**g**).

4- COMPOSITION DU MILIEU SABOURAUD :

Peptone pancréatique	5g
Peptone trypsine	5g
Glucose	20g
pH=6.3	

2- COMPOSITION DU MILIEU GELOSE POMME DE TERRE GLUCOSE : « PDA »

Extrait de pomme de terre (à partir de 200g)	
Glucose	20g
Gélose	15g
pH= 5.6	

5- COMPOSITION DE MILIEU WICKERHAM :

Peptone	10g
Extrait de levure	5g
Rouge de phénol	24mg
Eau distillée	1000ml
pH= 7.2	

6- COMPOSITION DU MILIEU WALLESTEIN LABORATOIRES NUTRIENT : « WLN »

Extrait de levure	4g
Peptone de caséine	5g
Glucose	50g
Phosphate monopotassique	0.55g
Chlorure de potassium	0.42g
Chlorure de calcium	0.12g
Sulfate de magnésium	0.12g
Chlorure ferrique	2.5mg
Sulfate de manganèse	2.5mg
Vert de bromocrésol	22mg
Gélose	20g
pH= 5.5	

7- METHODE DE NUMERATION DIRECTE : (CELLULE HEMATIMETRIQUE DE THOMA) :

Les cellules peuvent être comptées sous le microscope en utilisant une cellule de numération hématimétrique, par exemple celle de Thoma. Il s'agit d'une lame de verre épais qui porte à sa partie supérieure un réseau de lignes gravées perpendiculairement et qui délimitent 400 carrés de 1/20 de mm de coté :

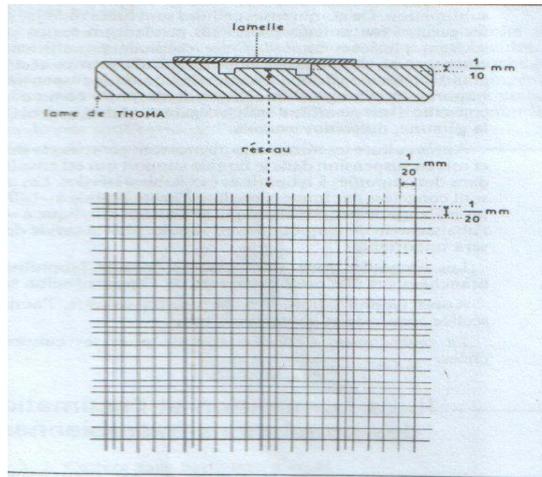
Une goutte de suspension de germe est placée sur la lame et recouverte d'une lamelle spéciale très plane. Cette lamelle repose sur deux renflements de la lame ce qui délimite au-dessus de chaque carré est donc de $\frac{1}{4 \times 10^6}$ ml.

L'examen s'effectue au microscope au grossissement x 40 le nombre de cellules (n_i) est compté dans p carrés, en général 100, puis la moyenne est effectuée :

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

Le nombre N de germes/ml de la suspension est ensuite déterminé $N= n. 4. 10^6$. Cette méthode est applicable facilement pour les levures et les spores fongiques mais elle est relativement imprécisé car il est difficile d'évaluer les amas et de tenir compte des bourgeons. Elle permet d'étudier la vitalité d'une souche par numération du pourcentage de cellules mortes et vivantes en colorant au bleu de méthylène.

Comme l'échantillon est trop concentré nous avons dilué afin d'effectuer la courbe d'étalonnage.

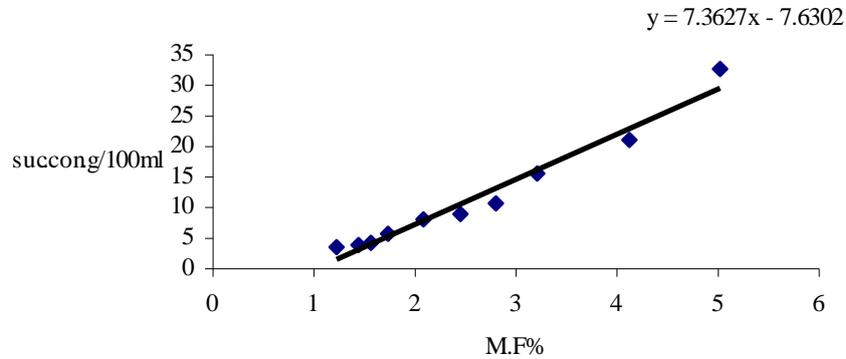


Cellule hematimetrique de Thoma.

M.F (%)	1.23	1.45	1.57	1.74	2.09	2.46	2.81	3.22	4.13	5.03
---------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Sucre consommé en g/100 ml	3.44	3.78	4.12	5.55	7.91	8.81	10.59	15.43	20.94	32.57
----------------------------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------

8- Evolution de la consommation du sucre en fonction de la matière fraîche produite



Evolution de la consommation de sucre par la levure *S. cerevisiae*

9- LE RENDEMENT PONDERAL :

Le rendement pondéral est défini comme étant le rapport entre la quantité de biomasse formée et la quantité des sucres consommés

$$R\% = \text{Quantité de biomasse} / \text{Quantité de sucre consommé} \times 100$$

Rendement pondéral de biomasse de la souche de *S. cerevisiae*

Moyenne de sucre consommé en g/100ml	11.3
Matière fraîche en %	3.91
Rendement pondéral en %	51