

Maîtrise de la fermentation alcoolique sous stress éthanolique, thermique et osmotique de la souche *Saccharomyces cerevisiae* YS-DN1 en vue de la préparation du vinaigre de fruits

M. Mounir^{1&2}, M. Belgrire¹, S. Lahnaoui¹, A. Hamouda³, P. Thonart², F. Delvigne², M. Ismaili Alaoui¹

(Reçu le 12/06/2016; Accepté le 29/06/2016)

Résumé

La présente étude a pour but d'isoler, d'identifier et de caractériser de nouvelles souches de levures d'intérêt industriel. Un total de 54 levures ont été isolées et identifiées à partir de produits agricoles brutes et de sous-produits de l'industrie agro-alimentaire. Parmi ces isolats, quatre souches ont été retenues, purifiées et testées pour leur performance de fermentation sur un jus de dattes de variété *Bouslikhène*. D'après le séquençage du gène 18S de l'ADN ribosomal, les deux souches YS-DN1 et YS-M isolées respectivement à partir des dattes et de la mélasse ont été identifiées appartenant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs, les deux autres souches YS-OPM et YS-G isolées des olives et des raisins appartiennent respectivement aux espèces *Kluyveromyces marxianus*, avec 78% d'homologie et *Candida utilis* à 89% d'homologie. D'autre part, la souche YS-DN1, s'est identifiée comme la plus performante dans la production d'éthanol en comparaison à deux autres souches industrielles de référence. La levure YS-DN1 était l'unique souche capable de croître à une température entre 35 et 40°C en présence d'un taux alcoolique élevé et une pression osmotique agressive. Finalement, la production de la biomasse cellulaire de la souche YS-DN1 a été améliorée par optimisation des facteurs température, Brix et pH fixés respectivement à 29.75°C, 15.7% et 4.15. Ces valeurs ont permis d'obtenir un maximum de cellules de l'ordre de 8.4x10⁸ UFC/ml. Il a été conclu que cette souche pourrait bien s'adapter à des usages industriels pour la production du vinaigre de fruits à grande échelle.

Mots clés: Isolement, levures, Fermentation, Vinaigre, Optimisation, Dattes, Stress.

Abstract

The purpose of the present study is to isolate, identify and characterize new yeast species of industrial interest. A total of 54 strains were isolated and identified from agricultural raw products and from by-products of the food industry. Among these, four strains were selected, purified and tested for their ability to perform efficient fermentation on *Bouslikhène* date juice. After the sequencing of the 18S gene of the ribosomal DNA, the two strains YS-DN1 and YS-M isolated respectively from dates and molasses have been identified belonging to *Saccharomyces cerevisiae* species. In addition, the other two strains, YS-OMP and YS-G isolated from olives and grapes belonged to *Kluyveromyces marxianus* (78% homology) and *Candida utilis* (89% homology) species, respectively. In addition, YS-DN1 strain showed the highest performance in terms of ethanol production in comparison with two other industrial reference strains. YS-DN1 strain was the only one that was able to grow at a temperature ranged from 35 to 40°C in the presence of a high alcoholic concentration and aggressive osmotic pressure condition. Finally, production of the cellular biomass of YS-DN1 strain was improved by optimization of temperature, Brix and pH fixed respectively at 29.75°C, 15.7% and 4.15. These values allowed to obtain a maximum of cells of about 8.4x10⁸ UFC/ml. It was concluded that this strain is well suited for fruit vinegar production at a large-scale.

Keywords: Isolation, Yeasts, Fermentation, Vinegar, Optimization, Dates, Stressors.

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique consiste en une biotransformation des jus de fruits ou toute solution sucrée en vin et fait intervenir des phénomènes physiques, biochimiques et biologiques complexes. Elle consiste en la transformation par les levures, principalement *Saccharomyces cerevisiae* des sucres du moût, principalement le glucose et le fructose en éthanol et en dioxyde de carbone (Nancy, 2008). Dans une fermentation alcoolique en batch, environ 30 à 35% de la source de carbone est convertie pour produire la biomasse cellulaire tandis que 50% d'hydrates de carbone

est transformée en éthanol. Le reste des sucres est utilisé pour la production de l'énergie et l'entretien des cellules (Hoda et al., 2010). Dans le processus de production du vinaigre, la fermentation alcoolique est l'étape qui précède l'acidification réalisée par les bactéries acétiques.

L'approche traditionnelle de l'identification des levures a été basée initialement sur une analyse phénotypique de la culture. L'isolat de levure est examiné pour une vaste gamme de propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques qui sont systématiquement comparées à la description standard pour donner une identité du

¹ Département des Sciences Alimentaires et Nutritionnelles, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202 Rabat, Maroc. mounirmajid@gmail.com

² Microbial Processes and Interactions Unit, Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liège, B-5030 Gembloux, Belgium

³ Département des statistiques appliquées, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, BP 6202 Rabat, Maroc

genre et de l'espèce (Beh et al., 2006). Par ailleurs, les méthodes moléculaires basées sur l'analyse de l'ADN sont maintenant utilisées pour identifier rapidement la levure jusqu'à son espèce. Plusieurs approches sont utilisées et la technique la plus définitive et universelle détermine la séquence des bases dans les segments de l'ADN ribosomal notamment celle du gène 18S (Redžepović et al., 2002).

La production d'un vinaigre de qualité supérieure et répétable est aujourd'hui indispensable pour satisfaire aux contraintes du marché. Cela passe nécessairement par un ensemble de techniques et d'instruments pour une maîtrise complète du processus d'élaboration, et en tout premier lieu de la fermentation alcoolique qui conditionne la suite du processus. Par conséquent, l'emploi des souches de levures sélectionnées et performantes s'inscrit totalement dans cette optique de contrôle de la fermentation.

Les sucres fermentescibles à l'état libre conviennent mieux pour le métabolisme fermentatif réalisé par les levures. La production de l'éthanol à partir des sucres présente une cinétique relativement simple qui ne comporte qu'une seule phase de croissance et de production au cours de laquelle les glucides sont transformés en biomasse cellulaire, éthanol et CO₂ (Zabed et al., 2014). Le glucose joue un double rôle cinétique. Il est limitant à faible teneur et devient inhibiteur à forte concentration (Yamaoka et al., 2014). Quant à l'éthanol, celui-ci devient inhibiteur à des concentrations élevées (Da Silva et al., 2013). Cette inhibition impacte la production de la biomasse mais aussi celle de l'éthanol et du CO₂. En anaérobiose, la levure *Saccharomyces cerevisiae* utilise souvent la glycolyse pour transformer les sucres en énergie directement utilisable par la cellule (Nancy, 2008).

Il est donc parfaitement établi qu'une souche de levure sélectionnée comme levain industriel devrait être en mesure de résister et de croître à des concentrations élevées en éthanol, connu pour son effet antimicrobien, durant toute la période de sa production. De même, ce type de levures, doit être aussi sélectionné selon son aptitude à tolérer des températures relativement élevées (> 35°C) pour qu'elles puissent croître et produire l'éthanol en quantités notables dans des climats chauds comme celui du Maroc.

Ce travail a été entrepris dans le but de sélectionner de nouvelles souches de levures afin qu'elles soient exploitées dans la production du vinaigre de fruits à une échelle industrielle. Dans la même optique, il est à signaler que dans une étude antérieure, de nouvelles souches performantes de bactéries acétiques, responsables de la deuxième phase de la préparation de vinaigre, ont été isolées et caractérisées pour leur pouvoir d'acétification et de thermotolérance (Mounir et al., 2016a; Mounir et al., 2016b).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement des souches de levures

Dans cette étude, la mélasse de canne à sucre (SURAC, Groupe COSUMAR, Dar-Gueddari) et trois types de préparations de fruits ont été utilisés pour l'isolement des souches de levures. Les préparations de fruits comprennent

trois origines différents; le moût de dattes de la variété Bouslikhène (Errachidia, Maroc), destiné à la production artisanale de l'alcool de dattes, des raisins de la variété Doukkali (région de Doukkala) et des olives de la variété Picholine marocaine (région de Meknès). Ces produits ont été récupérés dans des récipients stériles et conservés aseptiquement à 4°C jusqu'à utilisation. Les échantillons de dattes, de raisins et d'olives ont été découpés en morceaux et pressés aseptiquement en utilisant des gants stériles (Cappello et al., 2004). La mélasse et les extraits de fruits sont ensuite transférés sous flux dans des bouteilles Schott de 1 litre contenant le milieu d'enrichissement YPD ayant la composition suivante: glucose 20 g; peptone de caséine 10 g; extrait de levure 5 g et 1000 ml d'eau distillée. Cent mg de chloramphénicol sont ajoutés au milieu pour inhiber le développement bactérien (Beuchat, 1992). Les bouteilles étaient incubées ensuite à 30°C pendant 5 jours. Pendant cette durée, le CO₂, produit de la fermentation, est éliminé par une tuyauterie placée dans le couvercle des bouteilles. Un ml des moûts fermentés a servi à ensemencher en profondeur des boîtes de Pétri et mélangé ensuite au milieu de culture solide YPD à 7.5g d'agar. Après homogénéisation et solidification, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 48 heures en anaérobiose. Les jeunes colonies isolées et purifiées ont été stockées sur un milieu de gélose inclinée de Sabouraud à 4 °C et dans des microtubes à billes à -20°C pour une conservation prolongée.

Les souches isolées dans cette étude ont été comparées à deux souches de levures industrielles de référence. La première étant la levure commerciale de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* S1 de la marque "Rafiaa" (LESAFFRE, Maroc) qui se présente sous la forme de granules sèches actives. La deuxième est une souche *Saccharomyces cerevisiae* S2 utilisée dans la production industrielle de la bière (Brasseries du Maroc, Casablanca, Maroc).

Identification des souches de levures isolées

Identification phénotypique de base

La taxonomie des levures a été basée à la fois sur la détermination des caractères culturels, morphologiques et biochimiques (Hibbett et al., 2007). Nous avons choisi le kit commercial API 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) pour l'identification des souches isolées (Tan Kofli and Mohd Dayaon, 2010). Ce test basé sur la capacité des souches à assimiler les composés carbonés et azotés, et sur la fermentation des sucres est réalisé conformément aux instructions du fabricant dans des galeries composées de 20 cupules de 19 sucres différents et une cupule témoin. Une aliquote de 140 µl de la suspension des levures en milieu minimum (API C medium, turbidité = 2 Mc-Farland) est placée dans chaque cupule et la galerie est ensuite incubée pendant 24 à 48 h à 29 ± 2 °C. En plus, la détection de la présence du mycélium est réalisée sur milieu RAT (Riz Agar Tween). Les profils numériques ont été construits à partir des schémas de réaction pour servir à l'identification moyennant le catalogue analytique bioMérieux.

Identification moléculaire

L'identification des isolats a été ensuite réalisée en utilisant des méthodes de génétique moléculaire. Celles-ci ont concerné l'amplification du transcrit interne (ITS1) de la région 18S de l'ADN ribosomal (ADNr) des isolats par la technique de réaction en chaîne par polymérase (PCR) selon Redžepović et al. (2002).

L'ADN génomique total des isolats sélectionnés a été extrait à partir d'une culture fraîche cultivée sur milieu liquide YPD à l'aide du kit d'extraction Promega (Promega Corporation, Madison, USA). Les cellules ont été collectées après centrifugation (13000 rpm, 2 min) et remises en suspension dans 293 µl d'une solution EDTA 50 mM. Ensuite, 7.5 µl de lyticase (75 unités/µl) ont été ajoutées à la suspension qui est incubée pendant 60 min à 37 °C pour digérer la paroi levurienne. Un mélange de 300 µl de la solution à lyser la membrane nucléaire et 100 µl de la solution à précipiter les protéines ont été ajoutées aux cellules récupérées par centrifugation. L'ADN obtenu est précipité par ajout de 300 µl d'isopropanol et lavé dans 300 µl d'éthanol à 70%. L'ADN a subi une réhydratation dans 50 µl d'une solution contenant 10 mM Tris et 1 mM d'EDTA et le tout est conservé à 4°C. La quantité de l'ADN extraite est estimée par la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose.

L'amplification par PCR du gène 18S a été réalisée avec des amorces universelles constituées de Pri-A: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT -3' pour le segment codant et de Pri-B: 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC -3' pour le segment non codant (Medlin et al., 1988). La réaction PCR a été conduite dans un tube Eppendorf de 200 µl contenant 25 µl de Ready mix (Promega, USA), 2,5 µl de l'amorce Pri-A, 2,5 µl de l'amorce Pri-B, 1 µl d'ADN et 19 µl d'eau MilliQ. Les conditions de la réaction PCR, conduites dans un thermocycleur (Eppendorf, France) étaient comme suit: un premier cycle de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 5 min, 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation des amorces à 55°C pendant 30 secondes, une extension des amorces à 72°C pendant 2 min et un cycle d'extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits de la PCR ont été soumis à une électrophorèse à 100V sur gel d'agarose 1% dans un tampon TAE 50 x (40 mM Tris, 20 mM acide acétique et 1mM EDTA) contenant 1 µg/ml de bromure d'éthidium. Le poids moléculaire des produits de la réaction a été estimé en référence au marqueur du poids moléculaire (O'GenRuler™, 1KB DNA Lader); après quoi le produit a été ensuite purifié par kit PCR Preps Wizard® (Promega, Madison, USA) et quantifié sur gel d'agarose.

Le produit fini de la PCR a été séquençé moyennant le Kit Big Dye et l'analyseur ADN 3730 (Applied Biosystem, Japon). Le Tableau 1 présente les amorces utilisées pour le séquençage de l'ADN (Gardes and Bruns, 1993; Schoch et al., 2012). L'analyse de la séquence a été réalisée à l'aide du programme Codon-Code-Aligner et a été comparée à d'autres séquences disponibles dans la base de données GenBank du centre NCBI (National Center for Biotechnology Information). L'alignement avec les séquences de référence figurant dans la base de données est exprimé en pourcentage d'homologie.

Tableau 1: Liste des amorces utilisées pour le séquençage de l'ADN

| Amorce | Longueur | Séquences |
|--------|----------|----------------------------|
| SR2 | 15 | 5'-CGGCCATGCACCACC-3' |
| SR7 | 21 | 5'-GTTCAACTACGAGCTTTTAA-3' |
| SR7R | 20 | 5'-AGTTAAAAAGCTCGTAGTTG-3' |
| SR10R | 16 | 5'-TTTGACTIONAACACGGG-3' |

Préparation et caractérisation de jus de dattes

La préparation de jus de dattes a été réalisée selon la méthode de trempage inspirée de la méthode décrite par Nancib et al. (2001), mettant en œuvre une température d'extraction de 65 °C pour une durée totale d'extraction de 2 heures. Les dattes de la variété Bouslikhène (Errachidia, Maroc) ont servi pour la préparation du jus. Une fois les dattes lavées, dénoyautées et découpées, 3 litres d'eau distillée ont été ajoutés pour chaque kilogramme de dattes pesé. Le mélange dattes-eau est maintenu, sous agitation continue, à la température de traitement à l'aide d'un bain-marie. Le mélange est ensuite filtré à travers une toile filtrante pour obtenir le jus clair.

Le jus de dattes produit a été caractérisé moyennant la détermination d'un certain nombre de ses propriétés physicochimiques pour se rendre compte de son aptitude à la biotransformation. Parmi ces paramètres nous citons: le pH; l'extrait sec soluble massique (°Brix); l'acidité titrable; les taux de sucres réducteurs et totaux; les taux de minéraux et cendres; et enfin, le taux de protéines.

Mise en évidence du pouvoir fermentaire des souches sélectionnées

Les souches de levures identifiées ont été soumises à un test de production d'éthanol par comparaison aux souches de référence. Les souches ont été cultivées sur milieu synthétique et sur le jus de dattes. Les cultures ont été réalisées en triplicatas dans des erlenmeyers de 2 L, contenant chacun un litre de milieu liquide YPD standardisé à 30°C et en conditions statiques. Les erlenmeyers ont été inoculés avec les pré-cultures des souches testées à une concentration d'environ 10⁶ cellules/ml puis scellés par des bouchons en silicone pour assurer l'anaérobiose (Yamaoka et al., 2014). L'échappement du CO₂ est rendu possible par l'installation d'une tuyauterie en plastique stérile, trempée dans de l'eau et traversant les bouchons. La concentration du glucose et d'éthanol dans les mouts fermentés a été déterminée à intervalles de temps réguliers. La biomasse est suivie par mesure de la DO à 600 nm.

Tolérance aux facteurs stressants

Tolérance à l'éthanol

Le critère de choix de la sélection des souches de levures performantes se résume dans leur capacité à résister à des concentrations élevées en éthanol (Da Silva et al., 2013). Les levures ont été prélevées à partir de colonies, pures et fraîches, cultivées sur boîtes. Ces cellules ont servi à inoculer des erlenmeyers de 1 L contenant 500 ml de

milieu liquide YPD (2% glucose, 1% peptone de caséine et 0.5% extrait de levure) ajusté à pH 5. La concentration en alcool dans le milieu a été réglée à 6, 8, 10 et 12% (v/v) en ajoutant de l'éthanol absolu (Merck, Allemagne). L'ampicilline (500 mg/L) a été ajoutée dans la composition de la gélose YPD pour inhiber la croissance des bactéries (Da Silva *et al.*, 2013). La croissance cellulaire a été estimée par mesure de la DO à 600 nm et par ensemencement en surface des cellules viables diluées dans de l'eau physiologique (8.5% de NaCl) sur des boîtes de Pétri contenant la gélose YPD bien solidifiée.

Tolérance à la pression osmotique

Des concentrations élevées en sucres peuvent provoquer un stress osmotique sur les levures en croissance (Yamaoka *et al.*, 2014). Dans notre cas, différents jus de dattes à un taux de Brix de 12, 15, 18, et 21% (m/v) ont été préparés dans des erlenmeyers de 1L. Le pH final des jus est ajusté à 5. Ces Brix ont été obtenus à partir du jus de départ soit par dilution dans l'eau distillée soit par concentration sous vide à l'aide d'un rotavapor (Buchi, Allemagne). La croissance cellulaire a été également estimée comme décrit précédemment.

Tolérance à la température

Pour élucider l'influence de la température sur la croissance cellulaire des souches de levures choisies, trois températures différentes, 30, 35 et 40°C ont été étudiées et ceci, par plusieurs combinaisons variées avec les valeurs de la pression et du Brix citées auparavant.

Optimisation et modélisation de la production de biomasse de la levure sélectionnée

La concentration en biomasse est dépendante de plusieurs paramètres opératoires. Il est donc utile de connaître leurs effets et de pouvoir modéliser la variation de la biomasse en fonction de ces paramètres. Les plans d'expériences permettent une diminution considérable du nombre d'essais et une interprétation rapide et pratique. Dans cette partie, nous avons tenté de décrire l'influence de trois facteurs particulièrement la température, le degré Brix et le pH initial. Ces paramètres ont été jugés avoir une influence remarquable sur la croissance de la levure sélectionnée.

La méthode des surfaces de réponse (RSM) définit l'effet des variables indépendantes séparées ou combinées, et génère un modèle mathématique qui décrit l'ensemble de processus (Hoda *et al.*, 2010). En se référant aux expériences précédentes, nous avons travaillé dans des intervalles de 25 à 35°C pour la température, de 10 à 22 pour le °Brix et de 4 à 5.2 pour le pH. Puisque le modèle recherché est un polynôme du second degré, cinq niveaux codés allant de moins α à plus α ont été choisis pour chaque facteur. Ceci a conduit à la réalisation de 20 expériences indépendantes pour lesquelles le nombre de cellules viables a été compté après culture. Le traitement statistique a été effectué à l'aide du logiciel Minitab (v. 17.1.0. UK. 2003).

Mesures analytiques

- **L'éthanol:** 150 ml de l'échantillon est distillée pour récupérer 100 ml du distillat à travers une colonne réfrigérée. Le distillat est mis en suite dans un ébulliomètre (ALLA, France) est porté à ébullition. La teneur en alcool est déduite de la valeur de la température d'ébullition à l'aide d'une table fourni par le fabricant.

- **Les sucres:** Les sucres totaux et réducteurs ont été déterminés par la méthode de Luff Schoorl décrite par Osborne et Voogt (1979).

- **La densité optique (DO):** L'évolution de la densité cellulaire est estimée par spectrophotométrie à 600 nm (Yamaoka *et al.*, 2014) utilisant un spectrophotomètre JENWAY-6305.

- **Le pH:** déterminé par un pH-mètre Aiwa-AD1000.

- **L'acidité titrable:** a été déterminée par dosage avec du NaOH 1 N utilisant la phénolphthaléine comme indicateur.

- **L'extrait sec soluble massique (°Brix):** a été déterminé par un réfractomètre du type ATAGO RX-5000.

- **Les minéraux et cendres:** La composition en minéraux principaux est déterminé par spectroscopie d'émission utilisant un photomètre de flemme de marque Jenway/Sherwood-PFP7/C. Le taux de cendre est déterminé par calcination suivant la méthode décrite par Ould El Hadj *et al.* (2001).

- **Les protéines:** les protéines sont déterminées par la méthode de Kjeldhal selon le protocole repris par Lecoq (1965).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Identification des souches de levures isolées

Il était question d'isoler, à partir de produits locaux, des souches de levures ayant un important pouvoir de résistance aux conditions de stress tout en ayant une grande capacité à transformer des sucres fermentescibles en éthanol. Ces propriétés sont considérées comme des critères de choix pour la sélection des souches destinées à l'industrie (Lilly *et al.*, 2000).

Cinquante-quatre (54) isolats possédant les caractéristiques morphologiques qui correspondent à celles des souches de levures du genre *Saccharomyces* ont été retenus de l'ensemble des colonies isolées à partir des produits locaux étudiés.

Cependant, seuls les isolats qui ont montré une bonne croissance cellulaire en milieu liquide dégageant de l'odeur caractéristique d'éthanol ont fait l'objet d'un test d'assimilation des sucres à l'aide des galeries API 20C AUX. Quatre souches suspectes, isolées des échantillons utilisés semblent appartenir au genre *Saccharomyces* (Tableau 2). En se référant à la table d'identification fournie par bioMérieux et aux résultats des études précédentes (Manwar *et al.*, 2013; Maoura *et al.*, 2005; Willemsen *et al.*, 1997), les deux souches YS-M et YS-DN1, isolées respectivement de la mélasse de canne et des dattes, ont

pu métaboliser quasiment la totalité des sucres habituellement dégradés par *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutefois, l'identification moléculaire, notamment les techniques de classification phylogénique par l'amplification du transcrit interne (ITS1) de la région 18S de l'ADN ribosomal restent le moyen le plus sûr pour identifier les espèces de levures (Hibbett et al., 2007; Redžepović et al., 2002). L'ADN amplifié a été séquencé et comparé aux autres séquences de la base de données NCBI par le programme de recherche BLAST (Manwar et al., 2013).

Les deux souches YS-DN1 et YS-M isolées à partir des dattes et de la mélasse respectivement, appartiennent à 100% à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Par ailleurs, les deux autres souches YS-OPM et YS-G, isolées des olives et des raisins appartiennent respectivement à l'espèce *Kluyveromyces marxianus* avec une homologie de 78% et à l'espèce *Candida utilis* avec 89% d'homologie. Ces 4 espèces identifiées ont été signalées comme étant des souches impliquées dans la fermentation alcoolique notamment celle de la production des bières artisanales (Coulibaly et al., 2014; Jimoh et al., 2012; Maoura et al., 2005).

Pouvoir fermentaire des levures sélectionnées

Cette partie de l'étude s'intéresse à l'évaluation du pouvoir des quatre souches de levures identifiées à fermenter un jus de datte produit au laboratoire. Le tableau 3 illustre les caractéristiques du jus fermenté préparé à partir des dattes, variété Bouslikhène. Dans les conditions fixées préalablement, la fermentation a permis la production de quantités notables d'éthanol et les volumes obtenus ont été mesurés à intervalles réguliers (Figure 1). D'après cette figure, on note que la procédure de purification par cultures successives sur le milieu spécifique YPD a montré que ces souches possédaient un caractère fermentatif prédominant. En effet, les quatre levures testées ont pu métaboliser, avec des degrés variables, les sucres fermentescibles présents dans le jus de dattes pour produire l'éthanol. Toutefois, la souche YS-DN1 isolée à partir des dattes a donné la production la plus élevée en éthanol d'environ 7.9% (v/v) en un minimum de temps (12h). La mesure de la densité optique des cultures a montré que cette production en éthanol a été accompagnée également par une production maximale en biomasse exprimée en extrait sec cellulaire. Ce dernier était de 3.13 g/l pour la souche YS-DN1, tandis qu'il était de 2.82, 2.51 et 2.34 g/l respectivement pour les souches YS-M, YS-OPM et YS-G. C'est pourquoi, la souche YS-DN1 a été retenue pour les études ultérieures.

Tableau 2: Assimilation des sucres après 48-72°C (Galeries API 20C AUX)

| Code | Substance - test | Isolats | | | |
|------|---------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| | | YS-M ^a | YS-DN1 ^b | YS-OPM ^c | YS-G ^d |
| 0 | Aucun | - | - | - | - |
| GLU | D-GLUcose | + | + | + | + |
| GLY | GLYcérol | - | - | - | + |
| 2KG | Calcium 2-céto-Gluconate | - | - | v | - |
| ARA | L-ARAbinose | + | - | + | - |
| XYL | D-XYLose | - | - | + | - |
| ADO | ADONitol | - | - | - | + |
| XLT | XyLiTol | - | - | - | - |
| GAL | D-GALactose | + | + | - | - |
| INO | INOsitol | v | - | + | - |
| SOR | D-SORbitol | - | - | - | - |
| MDG | Méthyl-αD-Glucopyranoside | + | + | - | + |
| NAG | N-Acétyle-Glucosamine | - | - | + | - |
| CEL | D-CELlobiose | + | - | + | - |
| LAC | D-LACtose | - | - | - | - |
| MAL | D-MALtose | + | + | - | + |
| SAC | D-SACcharose | + | + | + | + |
| TRE | D-TREhalose | - | + | - | v |
| MLZ | D-MéLéZitose | + | + | + | + |
| RAF | D-RAFfinose | + | + | - | + |
| HYP | Présence des hyphes | v | - | - | + |

(a) - (b) : Isolats obtenu respectivement à partir de la mélasse de canne à sucre, de dattes, des olives et des raisins. Le résultat du test est une appréciation moyenne de trois échantillons de chaque souche testée.

V : variable.

Résistance de la souche YS-DN1 aux différentes conditions de stress

Puisque la souche YS-DN1 a donné la fermentation la plus importante parmi les souches testées, nous l'avons ensuite évaluée pour son aptitude à résister aux différents facteurs de stress notamment aux concentrations élevées en sucres fermentescibles et en éthanol et aux températures agressives.

La variation de l'effet combiné de différentes concentrations en éthanol et de température sur la biomasse des levures exprimée en nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) par millilitre de milieu est illustré par la figure 2. Le Brix des sucres demeure constant et maintenu égal à 12. D'après cette figure, il existe un effet répressif des concentrations croissantes en éthanol et des températures élevées sur le nombre de cellules viables des trois cultures. Globalement, la souche de bière reste la plus résistante aux concentrations élevées en éthanol. En effet, pour les deux températures 30 et 35°C et quasiment à toutes les concentrations en éthanol, cette souche a pu montrer le nombre le plus élevé en UFC, suivie par la souche YS-DN1. Cependant, à 40°C, cette dernière reste la seule souche qui a donné une croissance notable à des concentrations en éthanol de 4 et 6% (v/v). Elle présente un avantage particulier d'être thermo-tolérante malgré sa faible résistance à l'éthanol qui reste légèrement inférieure à celle de la levure de bière. Certains auteurs ont rapporté dans une étude similaire portée sur neuf levures sauvages isolées à partir de jus de canne que la croissance cellulaire devient pratiquement impossible lorsque la température atteint les 40°C et quand les concentrations en éthanol deviennent supérieures à 6% (v/v) (Da Silva *et al.*, 2013). Dans ces conditions, la souche YS -DN1 semble pratiquement être plus thermo-tolérante que la levure de bière et la levure boulangère. Ce comportement s'expliquerait par des changements métaboliques qui s'opèrent à l'intérieur des cellules. En effet, Mensonides *et al.* (2002) ont rapporté que l'élévation excessive de température jusqu'à un niveau stressant modifie les flux métaboliques à l'intérieur

des cellules en activité, aboutissant à l'apparition de sous-populations qui tolèrent des températures élevées mais avec un taux de croissance faible.

D'un autre côté, la performance technologique de la souche YS -DN1 a été évaluée également pour sa capacité à résister aux agressions osmotiques (Figure 3). Plusieurs cultures ont été accomplies en milieu synthétique YPD contenant des concentrations variables en sucre et à différentes températures. La figure 3 montre que les souches testées se sont développées de préférence dans 15 à 18 °Brix et des températures comprises entre 30 et 35°C. Toutefois, entre 12 et 15 de Brix, la souche YS-DN1 a montré le meilleur taux de croissance et de viabilité cellulaire. Tandis qu'à des températures inférieures à 35°C, c'est la levure de bière qui s'est développée aisément dans des Brix de 18 et 21. La souche YS -DN1 présentait aussi la croissance la plus élevée par rapport aux autres souches de référence à une température de 40°C lorsque le Brix est fixé à 15. Néanmoins, cette souche reste plus sensible à la pression osmotique que la levure de bière mais demeure plus résistante que la levure boulangère. Le phénomène de résistance des levures au stress osmotique est régi par la capacité de celles-ci à orienter leurs voies métaboliques à la synthèse de protéines impliquées dans le mécanisme de résistance. En effet, quand un changement brusque se produit dans des conditions d'osmolarité élevées, les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* réagissent en induisant transitoirement l'expression des gènes de protection contre le stress oxydatif tels que *msn2p* et *msn4p*. Les produits de ces deux gènes ont été décrits comme étant les facteurs de transcription qui déterminent l'efficacité de la réponse des cellules de levures aux stress osmotique (Rep *et al.*, 1999).

Suite à ces résultats, nous avons conduit notre étude pour une optimisation de la production de la biomasse cellulaire de la souche YS-DN1 présentant des caractères technologiques importants et encourageants pour la production industrielle du vinaigre à partir de fruits.

Tableau 3: Caractéristiques physico-chimiques du jus de dattes

| Caractéristique physico-chimique | Unité de mesure | Valeur* |
|----------------------------------|---------------------------------|---------|
| pH | - | 5,54 |
| Brix | % m/m | 14,89 |
| Acidité titrable | g d'acide acétique/100g produit | 0,3 |
| Taux de cendres | % m/m | 0,42 |
| Sucres réducteurs | % m/v | 12,99 |
| Sucres totaux | % m/v | 13,62 |
| Protéines | % m/v | 2,45 |
| Minéraux | K⁺ | 0,15 |
| | Na⁺ | 0,25 |
| | P | 0,38 |
| | Ca²⁺ | 0,24 |
| | Mg²⁺ | 0,096 |

* : Moyennes calculées à partir d'un minimum de trois analyses.

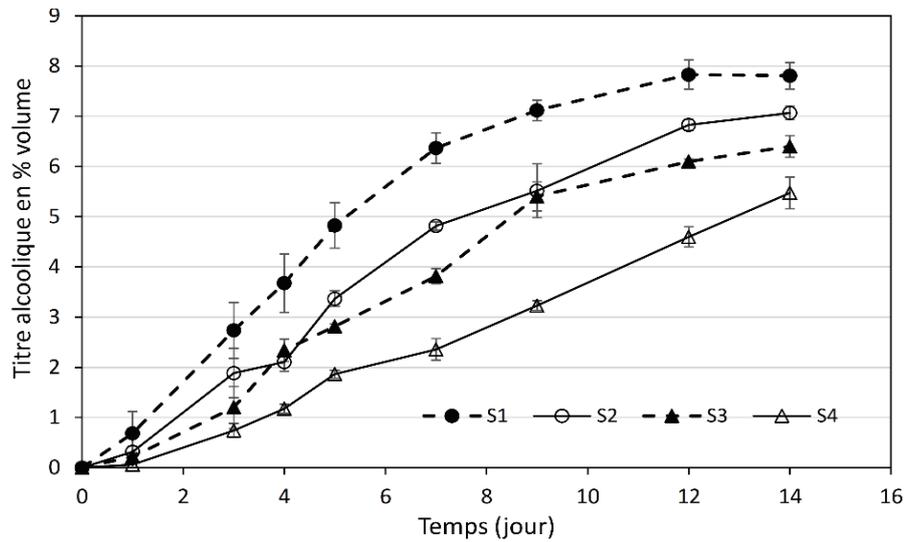


Figure 1: Fermentation alcoolique du jus de dattes par les quatre souches de levures isolées: cercles pleins (S1): levure de dattes YS-DN1; cercles vides (S2): levure de mélasse YS-M; triangles pleins (S3): levure olive YS-OPM; triangles vides: levure raisins YS-G.

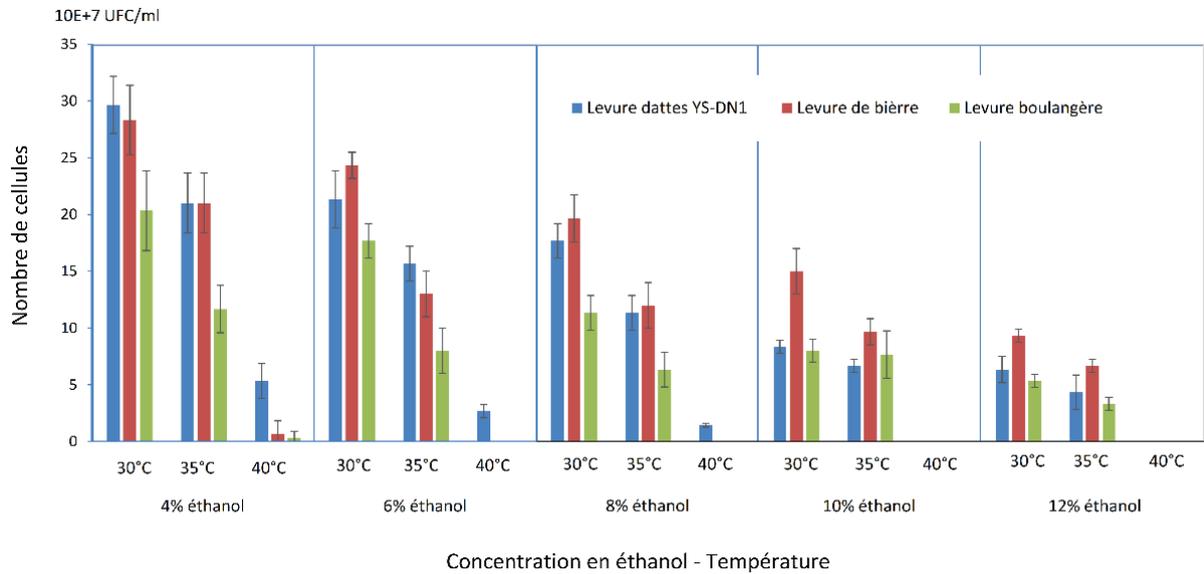


Figure 2: Résistance combinée aux facteurs éthanol - température de la souche YS -DN1 comparativement aux souches de référence

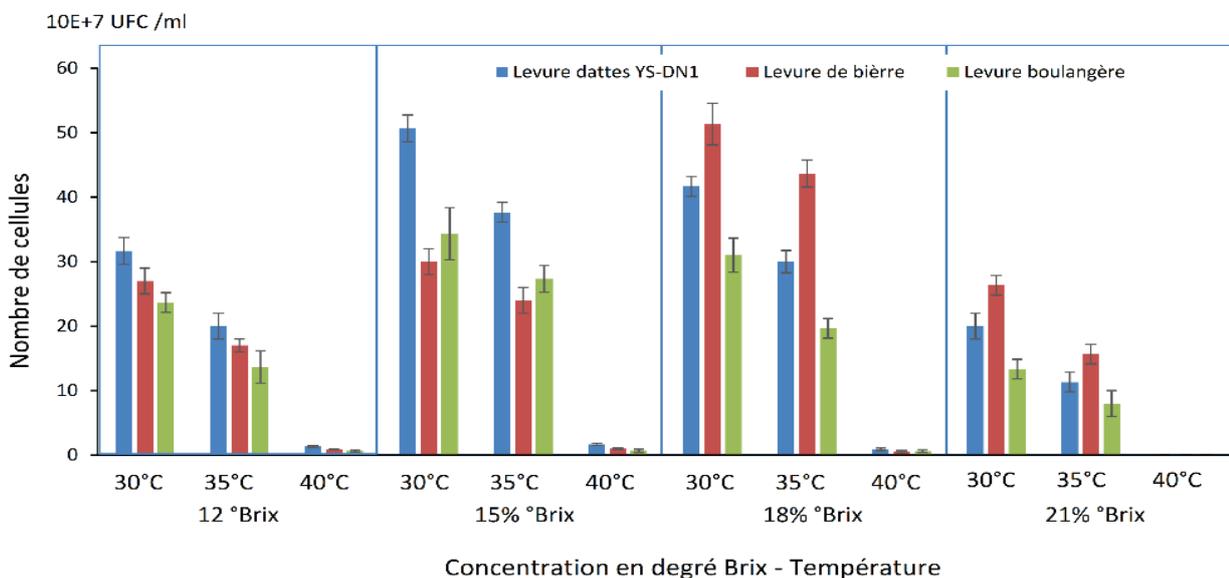


Figure 3: Résistance combinée aux facteurs pression osmotique - température de la souche YS -DN1 comparativement aux souches de référence

Tableau 4. Valeurs codées (entre parenthèses) et réelles des variables indépendantes

| Facteurs | Niveaux codés | | | | |
|------------------|---------------|------|------|------|---------|
| | (-1,682) | (-1) | 0 | 1 | (1,682) |
| Température (X1) | 25,0 | 27,0 | 30,0 | 33,0 | 35,0 |
| Brix (X2) | 10,0 | 12,5 | 16,0 | 19,6 | 22,0 |
| pH (X3) | 4,00 | 4,24 | 4,60 | 4,96 | 5,20 |

Tableau 5. Matrice des 20 expériences avec les niveaux codés

| Essai | Facteur en unités codées | | | Composition |
|-------|--------------------------|--------|--------|---|
| | Température | °Brix | pH | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 2 ^k = 8: essais du plan factoriel |
| 2 | 1 | -1 | -1 | |
| 3 | -1 | 1 | -1 | |
| 4 | 1 | 1 | -1 | |
| 5 | -1 | -1 | 1 | |
| 6 | 1 | -1 | 1 | |
| 7 | -1 | 1 | 1 | |
| 8 | 1 | 1 | 1 | |
| 9 | -1,682 | 0 | 0 | 2k = 6: essais en étoile sur les axes à une distance α du centre du domaine |
| 10 | 1,682 | 0 | 0 | |
| 11 | 0 | -1,682 | 0 | |
| 12 | 0 | 1,682 | 0 | |
| 13 | 0 | 0 | -1,682 | |
| 14 | 0 | 0 | 1,682 | |
| 15 | 0 | 0 | 0 | N ₀ = 6: Essais au centre du domaine |
| 16 | 0 | 0 | 0 | |
| 17 | 0 | 0 | 0 | |
| 18 | 0 | 0 | 0 | |
| 19 | 0 | 0 | 0 | |
| 20 | 0 | 0 | 0 | |

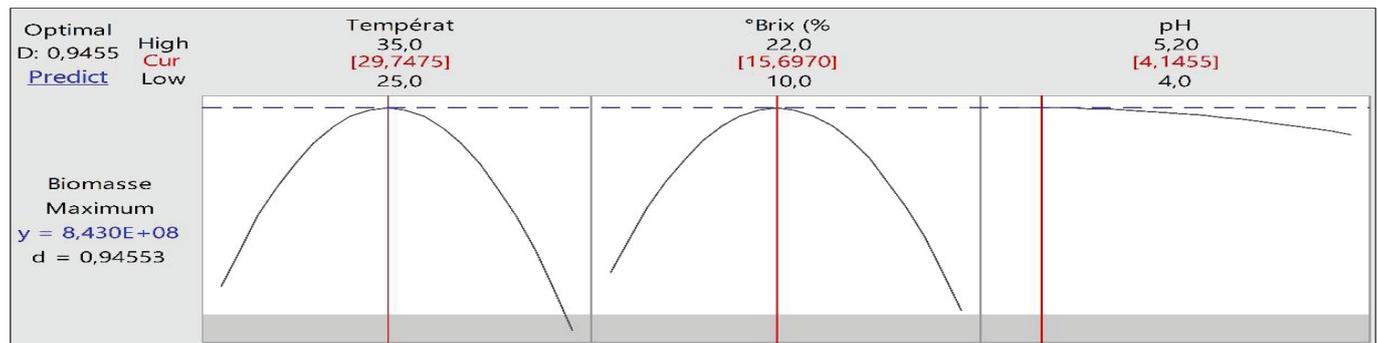


Figure 4: Valeurs optimales des variables indépendantes prédites par le modèle

Tableau 6: Signification des termes du modèle polynomial du second ordre

| Terme | Coef. | T _{obs} | Probabilité |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------|-------------|
| Constante | 8,19 10 ⁸ | 25,09 | <0,001 |
| Température (°C) | -7,48 10 ⁷ | -2,06 | 0,067 |
| °Brix (%) | -7,21 10 ⁷ | -1,99 | 0,075 |
| pH | -5,17 10 ⁷ | -1,43 | 0,182 |
| Température (°C)*Température (°C) | -7,87 10 ⁸ | -13,23 | <0,001 |
| °Brix (%)*°Brix (%) | -7,23 10 ⁸ | -12,16 | <0,001 |
| pH*pH | -3,38 10 ⁷ | -0,57 | 0,582 |
| Température (°C)*°Brix (%) | 1,18 10 ⁸ | 1,48 | 0,170 |
| Température (°C)*pH | 6,51 10 ⁶ | 0,08 | 0,936 |
| °Brix (%)*pH | -7,23 10 ⁶ | -0,09 | 0,929 |

Optimisation et modélisation de la production de la biomasse cellulaire de la souche YS-DN1

La souche la plus performante de levures isolées a été optimisée pour sa croissance sur le jus de dattes par l'application de la méthode des surfaces de réponse. Le plan composite centré défini par un nombre de 3 facteurs à 5 niveaux chacun a abouti à une matrice de 20 expériences à exécuter. Les tableaux 4 et 5 présentent, respectivement, les valeurs des niveaux codés et réels des variables indépendantes étudiées et la matrice des 20 expériences à réaliser.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour apprécier la qualité globale du modèle. La valeur observée de Fisher et celle de la probabilité correspondante du modèle étaient de 34,3 et $< 0,001$, respectivement, confirmant que le modèle adopté est hautement significatif. Le coefficient de détermination obtenu ($R^2 = 0,969$) signifie que 96,9% de la variation de la biomasse est attribuée aux variables indépendantes étudiées. Cela implique que la justesse et la fiabilité du modèle sont bonnes ($R^2 > 0,90$) (Li *et al.*, 2005). Le tableau 6 illustre les coefficients du modèle polynomial et fournit pour chaque terme la probabilité correspondante afin d'analyser l'importance de son effet sur la croissance cellulaire. Les résultats obtenus montrent que les trois effets d'interactions température et Brix, température et pH, et Brix et pH ne sont pas significatifs au seuil de signification 5%. Cependant, les conséquences quadratiques de la température et du degré de Brix sont très hautement significatifs (probabilité $< 0,1\%$). Ces résultats nous ont permis de simplifier le modèle par élimination des trois termes relatifs aux effets d'interactions et celui relatif à l'effet quadratique du pH. La biomasse de la levure YS-DN1 peut donc être exprimée par le modèle empirique simplifié suivant:

$$\text{Biomasse (UFC/ml)} = 8,19 \cdot 10^8 - 7,48 \cdot 10^7 (\text{T}) - 7,21 \cdot 10^7 (\text{°Brix}) - 5,17 \cdot 10^7 (\text{pH}) - 7,87 \cdot 10^8 (\text{T})^2 - 7,23 \cdot 10^8 (\text{°Brix})^2$$

Le plan de 20 expériences réalisé pour tester les combinaisons des niveaux des trois variables indépendantes étudiées ne contient probablement pas la combinaison recherchée permettant d'obtenir le maximum de biomasse cellulaire. Cependant, la fonction «Optimiseur de Réponse» du logiciel Minitab permet d'obtenir cette combinaison. Les valeurs optimales des facteurs étudiés, Température, °Brix et pH qui permettraient de prédire un maximum de biomasse cellulaire égale à $8,43 \times 10^8$ UFC/ml sont respectivement d'environ 29,75°C, 15,7% et 4,15 (Figure 4).

CONCLUSION

Du fait de leurs retombées économiques, les industriels du vinaigre montrent un intérêt croissant aux souches microbiennes (levures et bactéries acétiques) qui présentent une capacité de résistance aux stress environnementaux potentiellement agressifs.

La présente étude avait comme objectif la sélection de nouvelles souches naturelles de levures qui possèdent des performances technologiques qui les distinguent des souches similaires exploitables actuellement dans l'industrie nationale.

La souche YS-DN1 s'est montrée fortement capable de transformer les sucres fermentescibles en éthanol relativement à d'autres souches isolées de produits

locaux. Cette souche a pu croître convenablement à des températures élevées que la normale et résister à des concentrations en éthanol et des pressions osmotiques stressantes comparativement à la levure de bière et la levure boulangère utilisées comme souches de référence.

La production en biomasse cellulaire de la levure YS-DN1 a été optimisée par l'étude des facteurs influents tels que la température, le Brix et le pH moyennant l'application de la méthode des plans d'expériences. Les valeurs optimales de ces variables permettant l'obtention des concentrations maxima de cellules sont 29,75°C, 15,7% et 4,15, respectivement pour ces trois facteurs.

Nous pourrions conclure que la souche YS-DN1 isolée de dattes marocaines se prête à une utilisation pour la production de vinaigre de fruits à grande échelle. Des études futures visant sa conservation par la production de starters lyophilisés sont à envisager.

REMERCIEMENT

Les auteurs de cet article tiennent à remercier la Coopération Technique Belge pour le financement octroyé à M. Mounir dans le cadre de sa thèse en cotutelle entre l'IAV Hassan II (Maroc) et l'Université de Liège (Belgique).

RÉFÉRENCES CITÉES

- Beh A.L, Fleet G.H, Prakitchaiwattana C, Heard G.M.(2006). Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages. In A. D. Hocking, J. I. Pitt, R. A. Samson, & U. Thrane (Eds.), *Advances in Food Mycology* (pp. 69–106). Boston, MA: Springer US.
- Beuchat L. R (1992). Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *International journal of food microbiology*, 17: 145–158.
- Cappello M.S, Blevé G, Grieco F, Dellaglio F, Zacheo G (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97:1274–1280.
- Coulibaly W. H, N'Guessan K.F, Coulibaly I, Djè K. M, Thonart P (2014). Les levures et les bactéries lactiques impliquées dans les bières traditionnelles à base de sorgho produites en Afrique subsaharienne (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 18:209–219.
- Da Silva R.O, Batistote M, Cereda M.P (2013). Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, osmotic and ethanol stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56:161–169.
- Gardes M, Bruns T.D (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- Hibbett D.S, Binder M, Bischoff J.F, Blackwell M, Cannon P.F, Eriksson O.E (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111:509–547.

- Hoda S, Ghasem N, Sirous R, Mazyar S (2010). Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 16: 199–206.
- Jimoh S.O, Ado S.A, Ameh J.B, Whong C.M.Z, Anglais, A.T.E (2012). Characteristics and Diversity of Yeast in Locally Fermented Beverages Sold in Nigeria. *Research Journal of Biological Sciences* 6:389-392.
- Lecoq R (1965). Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Paris: Doin éditeurs.
- Li Y, Lu J, Gu G, Mao Z (2005). Characterization of the enzymatic degradation of arabinoxylans in grist containing wheat malt using response surface methodology. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63:171–176.
- Lilly M, Lambrechts M.G, Pretorius I.S (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyl transferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:744–753.
- Manwar J, Mahadik K, Paradkar A, Sathiyarayanan L, Vohra M, Patil S (2013). Isolation, biochemical and genetic characterizations of alcohol-producing yeasts from the flowers of *Woodfordia fruticosa*. *Journal of Young Pharmacists*, 5:191–194.
- Maoura N, Mbaiguinam M, Nguyen, H.V, Gaillardin C, Pourquie J (2005). Identification and typing of the yeast strains isolated from bili bili, a traditional sorghum beer of Chad. *African Journal of Biotechnology* 4(7), 646–656.
- Medlin L, Elwood H.J, Stickel S, Sogin M.L (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71:491-499.
- Mensonides F.I.C, Schuurmans J.M., De Mattos M.J.T., Hellingwerf K.J, Brul S (2002). The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. *Molecular Biology Reports* 29:103-6.
- Mounir M, Shafiei R, Zarmehrkorshid R, Hamouda A, Delvigne F, Ismaili Alaoui M (2016). Optimization of biomass production of *Acetobacter pasteurianus* KU710511 as a potential starter for fruit vinegar production. *African Journal of Biotechnology* 15:1429-1441.
- Mounir M., Shafiei R., Zarmehrkorshid R., Hamouda A., Ismaili Alaoui M., and Thonart P. (2016). Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121:166–171.
- Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, Benslimane C, Blanchard F, Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*. *Bioresource Technology* 78:149–153.
- Nancy N (2008). Etude des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Oenococcus oeni*: impact sur la réalisation de la fermentation malolactique en cultures séquentielles et mixtes. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Osborne herausgegeben von D.R, Voogt P (1979). *The Analysis of Nutrients in Foods*. (K. D. Schwenke, Ed.) *Food / Nahrung* (Vol. 23). London: Academic Press.
- Ould El Hadj M.D, Sebihi A.H, Siboukeur O (2001). Qualité hygiénique et caractéristiques physico-chimiques du vinaigre traditionnel de quelques variétés de dattes de la cuvette de Ouargla. *Revue des Energies Renouvelables*, 87–92.
- Redžepović S, Orlić S, Sikora S, Majdak A, Pretorius, I.S (2002). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology* 35:305–310.
- Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein J. M, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H (1999). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Molecular and cellular biology* 19:5474–5485.
- Schoch C.L, Seifert K.a, Huhndorf S, Robert V, Spouge J.L, Levesque C.a (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:1–6.
- Tan Kofli N, Mohd Dayaon S.H (2010). Identification of microorganism from Ragi for bioethanol production by API Kit. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, 10: 2751–2753.
- Willemsen M, Breynaert J, Lauwers S (1997). Comparison of Auxacolor with API 20 C Aux in yeast identification. *European Society of Clinical Infectious Diseases* 3:369–375.
- Yamaoka C, Kurita O, Kubo T (2014). Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiological Research* 169:907–914.
- Zabed H, Faruq G, Sahu J.N, Azirun M.S, Hashim R, Nasrulhaq Boyce A (2014). Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal* 2014.