



HAL
open science

Utilisation alimentaire des levures

Stéphanie Hencke

► **To cite this version:**

Stéphanie Hencke. Utilisation alimentaire des levures. Sciences pharmaceutiques. 2000. hal-01733295

HAL Id: hal-01733295

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733295>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

FACULTE DE PHARMACIE

**Utilisation alimentaire
des levures**

THESE



Présentée et soutenue publiquement le
Vendredi 30 juin 2000

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

HENCKÉ Stéphanie

Née le 17 juin 1975 à Nancy (54)

Membres du jury

Président : Mle HINZELIN

Maître de conférences

Juges : Mr MICLO
Mr LECTARD
Mr BAGREL

Professeur – ENSAIA
Professeur
Professeur

BU PHARM. ODONTOL.



D 104 053010 1

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

06 22777

FACULTE DE PHARMACIE

**Utilisation alimentaire
des levures**

THESE



Présentée et soutenue publiquement le

Vendredi 30 juin 2000

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par

HENCKÉ Stéphanie

Née le 17 juin 1975 à Nancy (54)

Membres du jury

Président : Mle HINZELIN

Maître de conférences

Juges : Mr MICLO
Mr LECTARD
Mr BAGREL

Professeur – ENSAIA
Professeur
Professeur

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Chantal FINANCE

Vice Doyen : Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

M^{le} BESSON Suzanne

M^{le} GIRARD Thérèse

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
M ^{le}	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
M ^{me}	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
M ^{me}	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
M ^{me}	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
M ^{le}	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
M ^{me}	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M. BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M. CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M. CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M. COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M. COULON Joël	Biochimie
M. DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M. DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M. FERRARI Luc	Biochimie
Mle FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M. GANTZER Christophe	Virologie
M. GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
M. GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mle HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M. HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M. JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M. LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M. MENU Patrick	Physiologie
M. MIGNOT Bernard	Physique
M. MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M. NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme PAULUS Francine	Informatique
Mme PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme PICHON Virginie	Biophysique
Mme POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M. VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M. DANGIEN Bernard	Botanique
Mme MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme PAVIS Annie	Parasitologie
M. TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme GRISON Geneviève	Pratiques officinales
----------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGE

M. COCHAUD Christophe	Anglais
-----------------------	---------

Remerciements

Mlle Hinzelin,

Vous m'avez fait l'honneur de présider cette thèse. Soyez-en très vivement remerciée. C'est dans votre accueil chaleureux que j'ai puisé la motivation nécessaire à la réalisation de ce très lourd travail. Par votre compétence et votre disponibilité, vous m'avez orientée dès que j'en ai eu besoin. Encore merci pour vos précieuses conseils et surtout pour vos encouragements.

Au jury,

Mr Mico,

Votre collaboration m'aura été indispensable. Vous avez très gentiment accepté de m'aider et de me guider dans le vaste domaine de l'agro-alimentaire. Il m'a été très utile de rencontrer le spécialiste des levures que vous êtes. Merci d'avoir cru en moi.

Mr Lectard,

Vous me faites honneur par votre présence au sein de ce jury. Je fais partie des derniers étudiants qui ont eu la chance d'assister à vos cours de mycologie. Rares sont les professeurs animés d'une telle passion pour un sujet, une passion qui a suscité l'intérêt que je porte aujourd'hui à la matière.

Veillez accepter, par ce travail, ma profonde reconnaissance.

Mr Bagrel,

C'est avec vous que j'achève mon cursus, sept longues années pendant lesquelles vous nous avez accompagnés. Je me souviendrai sans doute encore longtemps de vos qualités humaines, de votre sens du contact et surtout de votre humeur joviale. Merci d'être présent aujourd'hui.

A mes maîtres de stages,

Mme Houille,

Vous m'avez fait découvrir l'exercice officinal dans son détail. C'est à vous que je dois toute ma compétence pratique.

Ce dernier semestre aura été l'occasion pour moi de découvrir le métier de pharmacien. Au delà d'une formation, vous m'avez offert la chaleur d'une équipe amicale.

Merci pour votre patience, votre gentillesse et la qualité de vos conseils.

Mr et Mme Liégeois,

C'est avec vous que j'ai fait mes premiers pas dans le monde de la pharmacie.

Veillez trouver en ce travail toute ma reconnaissance.

A mes parents,

Voilà ! C'est aujourd'hui que j'accomplis mon rêve. Pendant ces longues années, vous avez levé chaque obstacle l'un après l'autre, patiemment, jour après jour... Je me suis battue pour en arriver là, mais je n'y serais jamais arrivée sans votre soutien.

Qui peut rêver de meilleurs parents que vous ?

A mon frère Emmanuel, Nelly sa femme et Leïla, ma petite puce,

Tu me soutiens, me protèges et m'encourages depuis notre plus tendre enfance. Malgré la distance qui nous sépare, j'aurai toujours besoin de toi.

A mon Papy et ma Mamy,

Vos encouragements incessants et votre amour sans limite m'ont permis de me battre. Cette réussite, c'est aussi à vous que je la dois. Je vous garde à jamais une grande place dans mon cœur.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines,

Trop nombreuses pour vous citer, chacun est intervenu à sa manière dans mes jeunes années et mon cursus universitaire. Il m'est important de vous savoir près de moi aujourd'hui.

A Rachel et Bruno,

Année après année, j'ai pu compter sur votre soutien et vos précieux conseils.

C'est avec vous que j'ai traversé les moments les plus forts de ma vie, les bons comme les mauvais, avec une confiance sans commune mesure.

Notre solide amitié a débuté sur les bancs de la fac. Quisse-t-elle durer éternellement.

A mes amies et amis,

*Emily, Anne Laure, Olivier, Ludovic,...amis de fac mais amis à jamais je
l'espère,*

Stéphane, Stéphanie, Laurent,...

à Franck...

A Mathilde, ma meilleure amie qui n'est plus,

j'aurais tant aimé l'avoir à mes côtés.

Et à tous ceux dont j'ai, un jour, croisé la route.

Loin de vous oublier, je vous adresse une pensée toute particulière.

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Partie I : GENERALITES

1. LA CELLULE

- 1.1. Organisation
 - 1.1.1. La paroi
 - 1.1.2. La membrane plasmique
 - 1.1.3. Le cytoplasme et les organites
- 1.2. Composition
- 1.3. Reproduction

2. TAXONOMIE

3. BESOINS NUTRITIONNELS

- 3.1. Besoins en carbone (glucides)
- 3.2. Besoins en azote
- 3.3. Besoins en lipides
- 3.4. Besoins en minéraux, oligo-éléments et vitamines
 - 3.4.1. phosphore
 - 3.4.2. soufre
 - 3.4.3. potassium
 - 3.4.4. magnésium
 - 3.4.5. calcium
 - 3.4.6. zinc
 - 3.4.7. manganèse
 - 3.4.8. autres
 - 3.4.9. vitamines
- 3.5. Besoins en eau



4. UNE CELLULE, DEUX METABOLISMES

- 4.1. Métabolisme en anaérobiose : la fermentation
 - 4.1.1. Définition
 - 4.1.2. Métabolites formés
 - 4.1.3. Différents types de fermentation
 - 4.1.4. Produits secondaires issus de la fermentation alcoolique :
les composés organoleptiques
 - a. Alcools supérieurs
 - b. Acides organiques
 - c. Esters
 - d. Aldéhydes et cétones
 - e. Composés soufrés
 - f. Terpènes
 - g. Lactones
- 4.2. Métabolisme en aérobie : respiration ou « voie oxydative »
- 4.3. Types métaboliques
- 4.4. Influence de l'environnement
 - 4.4.1. Température
 - 4.4.2. pH
 - 4.4.3. Pression osmotique et activité de l'eau
 - 4.4.4. Pression atmosphérique
 - 4.4.5. Oxygène
 - 4.4.6. Agents chimiques

❖ Chapitre I : BOISSONS ALCOOLISEES

1. LA BIÈRE

- 1.1. Définition
- 1.2. Classification légale française
- 1.3. Consommation
- 1.4. Production
- 1.5. Matières premières
- 1.6. Préparation
- 1.7. Comportement des levures
 - 1.7.1. Fermentation primaire ou « principale »
 - a. Etapes
 - b. Facteurs influençant la fermentation
 - c. Fermentations haute et basse
 - 1.7.2. Fermentation secondaire ou « garde »
- 1.8. Caractéristiques des souches de brasserie
- 1.9. Composition et propriétés de la bière

2. LE VIN

- 2.1. Historique
- 2.2. Production
- 2.3. Consommation
- 2.4. Composition et caractéristiques du moût
- 2.5. Fabrication du vin
 - Différents types de vinification
- 2.6. Processus fermentaire
 - 2.6.1. Fermentation spontanée
 - 2.6.2. Fermentation contrôlée et levurage
 - 2.6.3. Les 2 types de fermentation du vin
- 2.7. La microflore de la fermentation vinair
- 2.8. Succession d'espèces de levures
- 2.9. Rôles de la levure
- 2.10. Génie génétique, amélioration des souches

3. LE CHAMPAGNE

- 3.1. Quelques chiffres
- 3.2. Préparation
- 3.3. La champagnisation industrielle

4. LE CIDRE

- 4.1. Le milieu
- 4.2. Microflore levurienne
- 4.3. Sélection des souches
- 4.4. Contrôle de la fermentation

- 2.7. Rôles de la levure
 - 2.7.1. La levée de la pâte
 - 2.7.2. Développement des arômes et de la flaveur
- 2.8. Paramètres influençant la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*
- 2.9. Caractéristiques des levures de boulangerie

3. LES LEVURES-ALIMENT

- 3.1. Définition et composition
 - ❖ Protéines
 - ❖ Minéraux
 - ❖ Vitamines
- 3.2. Production
 - 3.2.1. Choix de la souche
 - 3.2.2. Substrats
 - 3.2.3. Procédé
 - 3.2.4. Rendement
- 3.3. Utilisation en alimentation
 - 3.3.1. Avantages
 - 3.3.2. Rôles en alimentation
 - 3.3.2.1. Humaine
 - 3.3.2.2. Animale
 - 3.3.3. Mode d'emploi
 - 3.3.4. Propriétés
 - 3.3.4.1. Propriétés chez l'homme
 - 3.3.4.2. Propriétés chez l'animal
 - 3.3.5. Levures cultivées sur hydrocarbures
 - 3.3.6. Toxicité et innocuité chez l'homme

❖ CHAPITRE III : Aliments fermentés d'origine végétale

1. A BASE DE SOJA

- 1.1. Sauce de soja
- 1.2. Miso
- 1.3. Tempeh
- 1.4. Intérêt nutritionnel

2. LEGUMES FERMENTES

3. FERMENTATION DU CACAO

- 3.1. Phase anaérobie
- 3.2. Phase aérobie

4. FERMENTATION DU CAFE

5. LE SAKÉ

- 5.1. Procédé de fabrication
 - 5.1.1. Matières premières
 - 5.1.2. Protocole
 - 5.1.3. Fermentation
- 5.2. Microflore

6. LES BOISSONS DISTILLEES

- 6.1. Le milieu
- 6.2. Micro-organismes impliqués
- 6.3. Fermentation industrielle et levurage
- 6.4. Cas particulier du rhum

❖ Chapitre II : PRODUCTION DE BIOMASSE LEVURIENNE

1. PRODUCTION DE BIOMASSE VIVANTE = FERMENTS

- 1.1. Groupes industriels
- 1.2. Production
 - 1.2.1. Substrats
 - 1.2.2. Procédé de fabrication Lesaffre
- 1.3. Passage aux différentes formes commerciales
 - 1.3.1. Levure pressée
 - 1.3.2. Levure émietée
 - 1.3.3. Levure sèche
 - Levure sèche active, L.S.A.
 - Levure sèche instantanée, L.S.I.
 - 1.3.4. Levures sèches à pouvoir réducteur
 - 1.3.5. Crème de levure
- 1.4. Conservation
- 1.5. Emplois

1. LE PAIN

- 2.1. Historique
- 2.2. Définitions
- 2.3. Consommation
- 2.4. Production
- 2.5. Ingrédients
- 2.6. Schémas de fabrication
 - 2.6.1. Mécanisme de la panification
 - 2.6.2. Procédés de fabrication du pain français
 - Méthode directe
 - 2.6.3. Technique au levain naturel
 - Flore naturelle des céréales
 - Composition de la flore des levains
 - Technique sur levain
 - 2.6.4. Diagramme intermédiaire : « levain/levure »
 - 2.6.5. Evolution des techniques de fabrication
 - 2.6.6. Cas du pain surgelé

❖ CHAPITRE IV : Aliments fermentés d'origine animale

1. FROMAGES

- 1.1. Espèces dominantes dans quelques fromages
- 1.2. Rôles des levures en fromagerie
 - 1.2.1. Fermentation alcoolique du lactose; assimilation du lactose et de l'acide lactique - Inhibition ou stimulation du développement d'autres micro-organismes
 - 1.2.2. Lipolyse et protéolyse
 - 1.2.3. Morageage
- 1.3. Sélection de souches

2. KEFIRS

- 2.1. Le grain de kéfir
- 2.2. Interactions entre les micro-organismes
- 2.3. Conservation des grains
- 2.4. Fabrication traditionnelle
 - 2.4.1. Fabrication du kéfir lacté
 - 2.4.2. Fabrication du kéfir sucré
- 2.5. Caractéristiques de la boisson

3. PRODUITS CARNES FERMENTES

❖ CHAPITRE V : Autres

1. PRODUCTION D'ALCOOL INDUSTRIEL

- 1.1. Substrats
- 1.2. Sélection des souches

2. PRODUCTION DE PIGMENTS

INTRODUCTION

Les micro-organismes sont très largement répartis dans notre environnement puisqu'ils peuvent occuper plus ou moins sélectivement la terre, l'eau, l'air, selon les conditions de pH, de température et d'humidité qui y règnent.

Les études portant sur ces êtres vivants ont débuté bien plus tard que n'a commencé leur emploi, les scientifiques n'ayant pu initier leurs travaux qu'après l'apparition du microscope en 1680.

Dans ce travail, nous ne traiterons que des levures, non que leur intérêt soit prépondérant par rapport à celui des bactéries, des virus et des autres champignons, qui font d'ailleurs l'objet d'autres thèses. De même, seul l'aspect positif sera envisagé : nous n'aborderons donc pas l'intervention des levures en pathologie, ou comme agent d'altération des aliments.

Une première partie présentera au lecteur quelques notions générales sur les levures : leur physiologie, leurs modes de reproduction et surtout, leurs différents types de métabolisme selon les conditions du milieu.

Ensuite, nous envisagerons, un à un, leurs différents secteurs d'application dans les industries agro-alimentaires, à commencer par le vaste domaine des boissons alcoolisées, où la levure y est très largement utilisée sous forme vivante, et conservée par cultures sur milieux appropriés.

Puis il sera question de l'aliment en tant que tel, soit parce que la levure intervient dans son élaboration, soit parce qu'elle est considérée comme un aliment à part entière.

Nous traiterons ensuite de la fermentation de divers produits d'origine animale ou végétale, et terminerons par deux domaines d'application marginaux.

Force est de constater que les levures sont très largement représentées dans les industries agro-alimentaires, soit parce que l'on a voulu convoiter leur métabolisme (production d'alcool, de gaz carbonique ou de composés aromatiques), soit parce que leur composition en fait de véritables aliments.

PARTIE I

GENERALITES

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes (noyau délimité), non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles. Le thalle de la levure est l'appareil végétatif le plus simple, sans racine ni tige, sans rameau feuillu et non chlorophyllien (44, 10, 38, 49, 75).

Leur morphologie est d'une grande importance taxonomique. Les cellules sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, allongées, apiculées ou de formes plus spécifiques : ogivales (genre *Dekkera*), en forme de bouteille (genre *Pityrosporum* (= *Malassezia*)), triangulaires (*Trigonopsis*) ou en forme de citron (*Hanseniaspora*) (10, 48, 52).

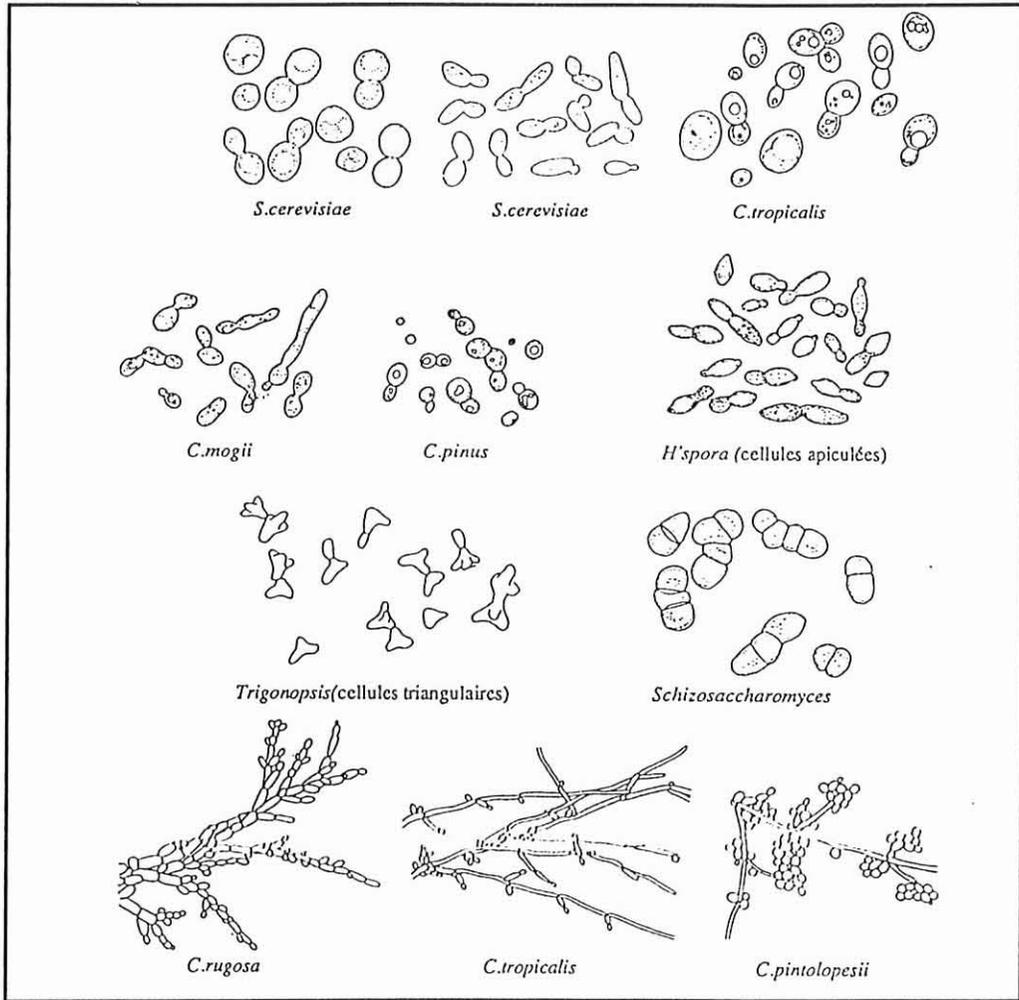
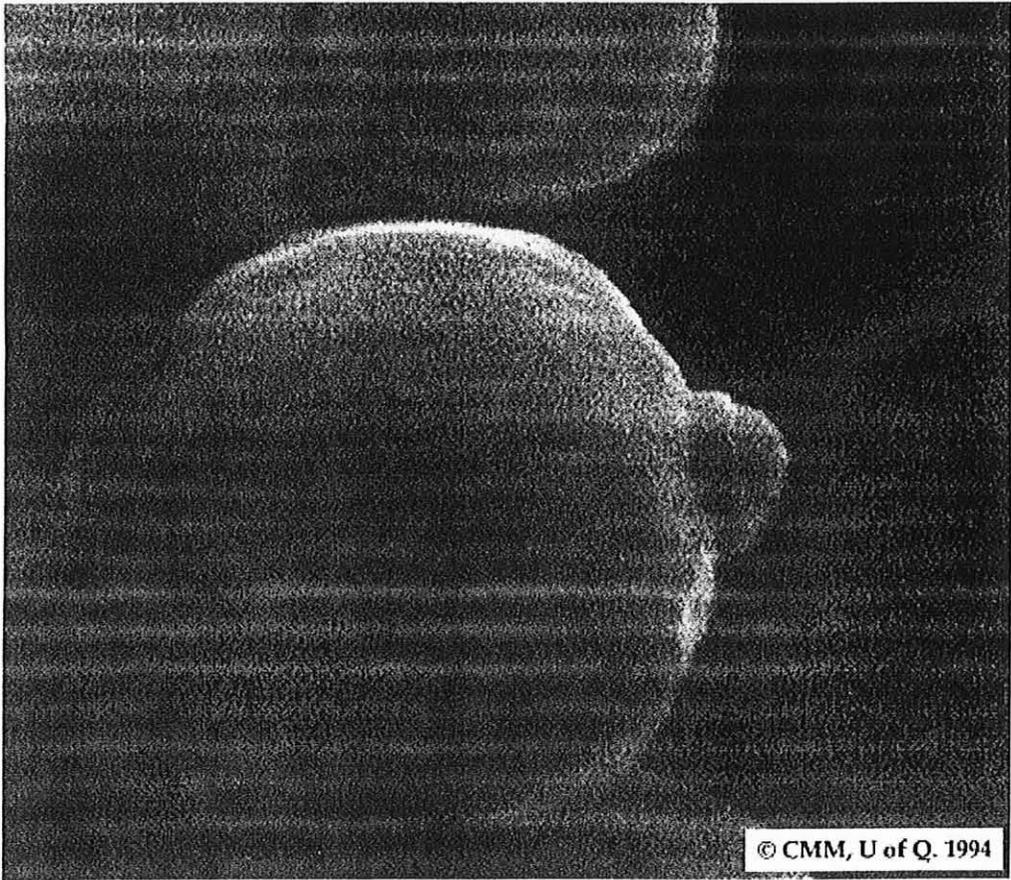
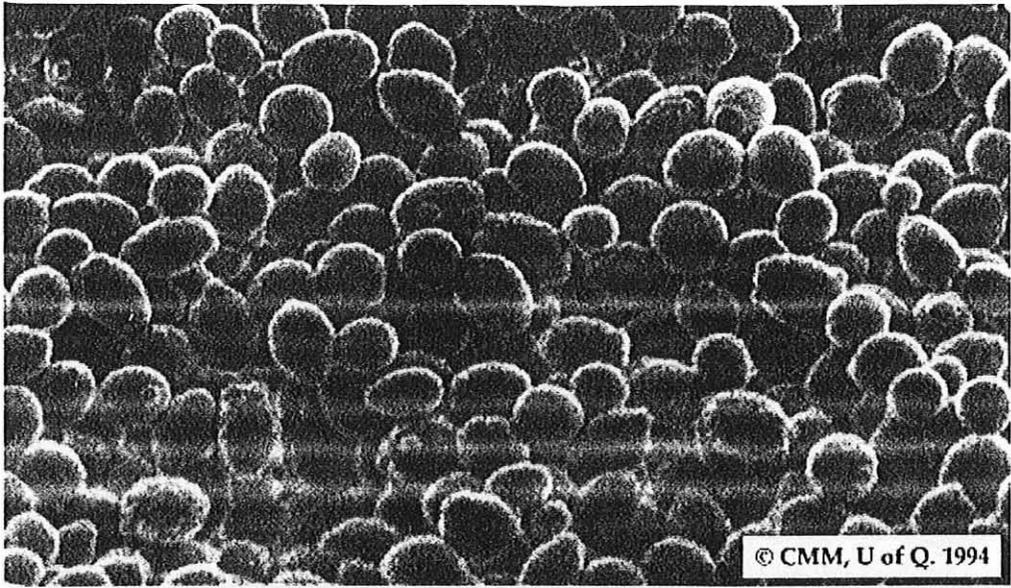


Fig.1 : Morphologie des cellules de levure et des mycelium (52)

Leur taille est d'environ 20 μm en longueur et de 1 à 10 μm en largeur (31). Les levures sont de grande taille par rapport aux bactéries ce qui rend possible l'examen direct (38). La masse cellulaire des levures est 100 fois plus grande que celle des bactéries et elles se divisent 4 fois moins rapidement. De par leur croissance moins rapide, elles ne peuvent donc pas leur nuire en épuisant les réserves nutritives du milieu. Néanmoins, elles peuvent aisément supporter leur compétition (3). Par ailleurs, elles sont parfois utiles à d'autres micro-organismes comme les bactéries lactiques à qui elles apportent les acides aminés nécessaires (48).

1. LA CELLULE



levures (2.000 et 10.000 x)

Photo. 1 (68)

1.1. Organisation

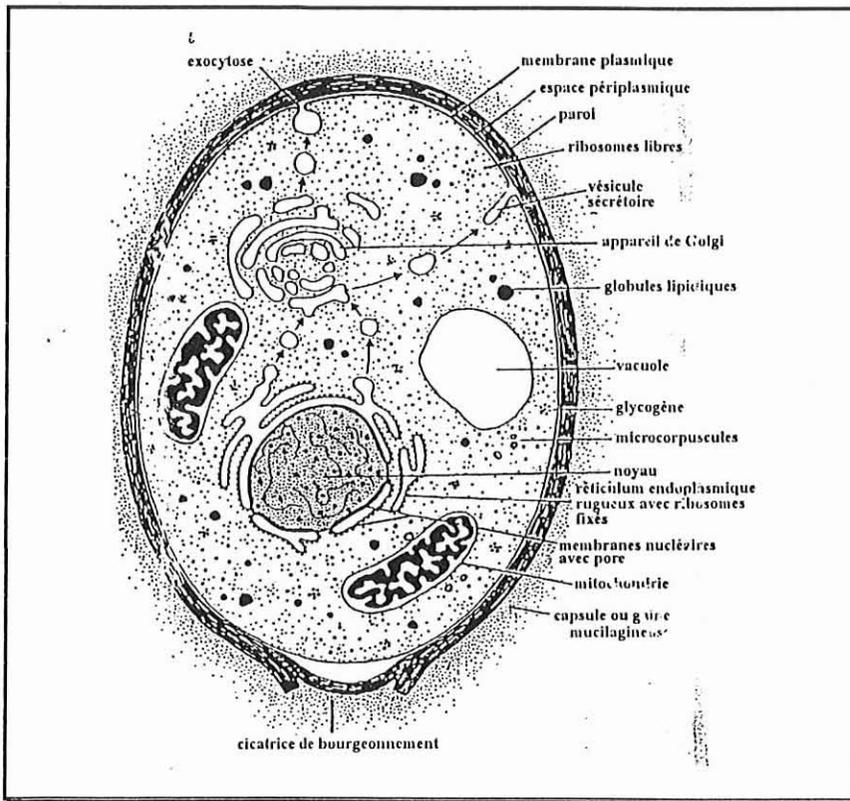


Fig. 2 : Structure cellulaire des levures (48)

1.1.1. La paroi

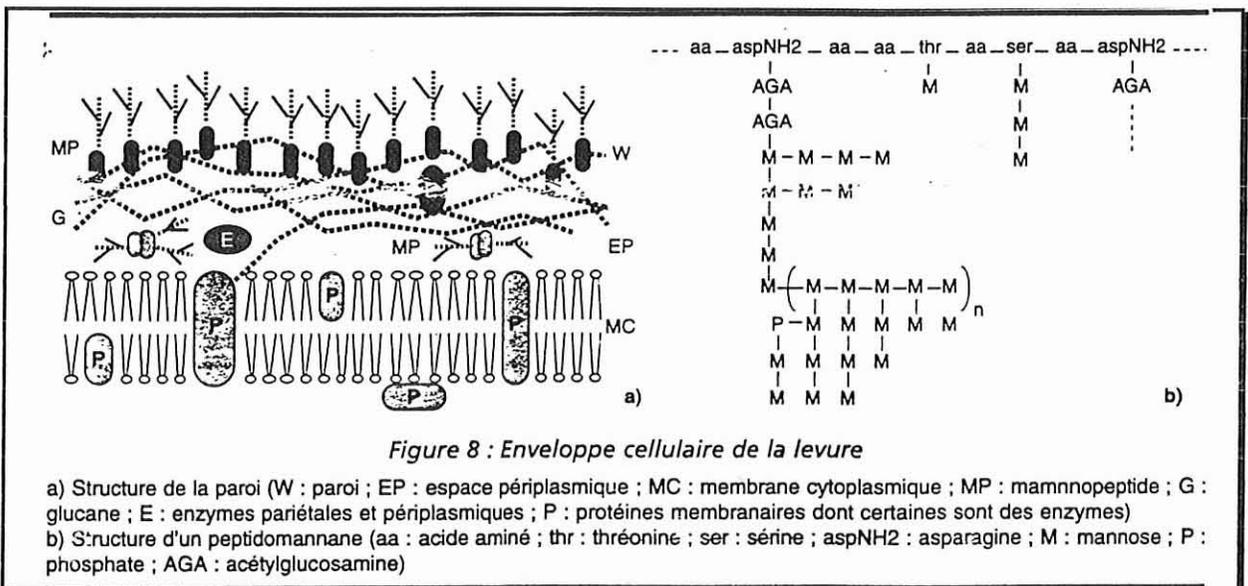


Fig. 3 : Enveloppe cellulaire de la levure (38)

La **composition** de la paroi est la suivante :

- 80 % de **polysaccharides antigéniques** (mannanes, β glucanes, polyosides hétérogènes) et 1 à 2 % de chitine (48,38),

Les polysaccharides principaux de la paroi sont les mannanes et les glucanes (10).

Il existe trois types de mannanes :

- les peptidomannanes intervenant dans la structure pariétale,
 - les mannoprotéines de nature enzymatique,
 - les peptidomannanes impliqués dans les phénomènes de floculation et d'agglutination sexuelle (10, 48).
- 5 à 10 % de **protéines**. Ce peut être des invertases ou autres hydrolases (23). En fait, la paroi comporte de nombreuses enzymes parmi lesquelles des invertases, des phosphatases acides, des β glucosidases, des protéases ... (9),
- 7 à 10 % de **lipides** (48),
- 5 % de **minéraux** (48).

La paroi, épaisse, s'**organise** en trois couches :

- la couche externe, qui comporte essentiellement des mannanes (gomme des levures), des protéines en faible quantité, ainsi que de la chitine (polymère de NAc Glucosamine) surtout présente au niveau des cicatrices de bourgeonnements (44, 23, 48),
- la couche médiane constituée de microfibrilles de glucanes (cellulose des levures) (23),
- la couche interne composée de lipides, de protéines enzymatiques, de phosphate, et de glucanes (23).

Épaisse de 150 à 230 nm, en plus de conférer à la cellule sa forme caractéristique de par sa rigidité, la paroi assure une protection physique externe et rend la cellule complètement perméable à l'eau, aux minéraux et aux petites molécules (48, 38, 37).

La paroi est parfois entourée d'une **capsule mucilagineuse** hydrosoluble de nature polysaccharidique (*Cryptococcus*) (44, 9).

1.1.2. La membrane plasmique

La **membrane plasmique**, ou **plasmalemme**, délimite le compartiment cytoplasmique. Elle est constituée de glycoprotéines et de glycolipides qui assurent une perméabilité sélective (23).

Ainsi, elle laisse circuler l'eau et certains solutés mais empêche le mouvement des grosses molécules (37).

1.1.3. Le cytoplasme et les organites

Le **cytoplasme** abrite l'ensemble des organites (37, 38, 9) :

- le **noyau**, généralement unique et de petite taille, contenant jusqu'à 17 paires de chromosomes identiques ou différents et les plasmides. La cellule peut être haploïde, diploïde, ou polyplôïde (souches industrielles surtout) (38).

Le plasmide 2μ est un élément extra chromosomique présent dans presque toutes les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Il est très utilisé en tant que vecteur au cours des

transformations. On en trouve également chez *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Z. baillii*, *Z. bisporus* (48).

Constitué d'un nucléole et d'un nucléoplasme, le noyau gouverne la synthèse protéique (23, 37).

Il est entouré d'une membrane nucléaire qui persiste pendant la division cellulaire (10).

- les **ribosomes**, sites de synthèse des protéines (37),

- le **réticulum endoplasmique** et l'**appareil de Golgi**, réseau de membranes intervenant dans la sécrétion des protéines (37),

- les **mitochondries**, véritables centrales énergétiques en aérobiose, dont le rôle est d'utiliser les sucres pour produire de l'énergie et permettre à la cellule d'assurer sa croissance (37, 8). Elles sont le siège de l'activité respiratoire (23, 41) mais si la concentration en glucose est inférieure à 5 %, la synthèse de cytochromes est arrêtée et la respiration stoppée (9). Elles assurent également la phosphorylation oxydative (41),

- enfin, une **large vacuole** au centre des cellules matures, délimitée par le tonoplaste. Le nombre des vacuoles et leur taille est fonction de l'âge des cellules. Elles sont riches en enzymes solubles, en particulier en hydrolases. C'est aussi le lieu de stockage des différentes substances de réserve (23, 48) :

- le principal polysaccharide de réserve, le glycogène, qui peut occuper jusqu'à 12 à 23 % du poids de la cellule. Il est accumulé quand l'azote devient limitant et qu'il reste encore du glucose dans le milieu (52, 9),

- le tréhalose qui peut représenter jusqu'à 16 % du poids de la cellule (9). Il est dégradé très lentement après la disparition du glycogène dans la cellule. Ce métabolisme lent semble important car la viabilité et les capacités fermentaires chutent rapidement après son épuisement. Son stockage est d'une grande importance dans les cas où la cellule va subir une agression (séchage, pression osmotique élevée, surgélation) (37).

En forte concentration dans les ascospores, il est dégradé au moment de la germination (52).

La tréhalose-synthétase et la glycogène-synthétase sont inhibées par le glucose. La synthèse du tréhalose suit celle du glycogène (52). Ces 2 sucres apparaissent en cas de respiration ou d'adaptation à un nouveau milieu. Du tréhalose peut être sécrété en réponse à un stress (osmotolérance) (9).

La vacuole contient également des acides aminés libres (9).

- sans oublier les **lysosomes**, **peroxysomes**, autres **vacuoles**... (9).

L'ADN a donc plusieurs origines :

- chromosomique

- mitochondriale : la perte de cet ADN n'entraîne pas la mort de la cellule mais sa vitesse de fermentation est fortement réduite.

- plasmidique : les fonctions de cet ADN sont inconnues ; sa perte n'a pas de conséquences défavorables pour la levure.

La cellule comporte, en plus, de l'ARN double brin cytoplasmique codant pour une protéine toxique (caractère killer) (41).

1.2. Composition

	%		%
Matières sèches (M.S.)	30,0 à 33,0		
Azote/M.S.	6,5 à 9,3		
Protéines/M.S. (azote x 6,25)	40,6 à 58,0	dont	glutathion 0,5 à 1,5
Glucides/M.S.	35,0 à 45,0	dont	glycogène 5 à 10 tréhalose 8 à 20
Lipides cellulaires/M.S.	4,0 à 6,0	dont	phospholipides 1 à 2
Minéraux/M.S.	5,0 à 7,5	dont	potassium 0,8 à 2,0 sodium 0,01 à 0,2 calcium 0,02 à 0,15 magnésium 0,04 à 0,18 phosphore 0,8 à 1,3 (P ₂ O ₅) 2,0 à 3,0
Vitamines		dont	Thiamine (B1) 0,002 à 0,015 Riboflavine (B2) 0,002 à 0,008 Pyridoxine (B6) 0,002 à 0,006 Niacine (PP) 0,010 à 0,050

Tab.1 : Composition moyenne des levures (37)

Elle peut varier selon le type de levure, les conditions de conservation ainsi que l'âge des cellules (37, 9). La composition spécifique de chaque type de levure sera envisagée plus en détails dans la partie concernant les levures-aliment.

1 – Les levures sont très riches en **protéines** et notamment en enzymes qui témoignent d'une activité métabolique importante. La teneur en protéines est directement liée au pouvoir fermentatif et à l'aptitude à produire la biomasse (37).

2 – Les **glucides** sont représentés par les glucanes et mannanes de la paroi, le glycogène et le tréhalose.

3 – Les **lipides**, constitués par les lipoprotéines et les phospholipides de la membrane plasmique. Ils permettent de maintenir ses propriétés au cours des différents procédés de séchage pour l'obtention de la levure sèche active. (37) La teneur en lipides peut atteindre jusqu'à 50 % du poids de la levure quand l'azote est limitant (9).

4 – Les **minéraux** : ils sont essentiellement représentés par le phosphore qui est inclus dans la formation des acides nucléiques, de la membrane, et des molécules énergétiques (37).

	Levures	Moisissures	Bactéries
Temps de génération	≈ 3 heures	5 à 12 heures	≈ 30 minutes
Teneur en protéines totales* (maximum)	60 %	75 %	80 %
Teneur en acides nucléiques**	4 à 10 %	3 à 5 %	10 à 16 %

* Par rapport au poids sec.
** Chez l'homme les acides nucléiques se transforment en acide urique ; par conséquent leur taux doit être faible dans les P.O.U. destinés à l'alimentation humaine.

Tab.2 : Teneur en protéines (32)

1.3. Reproduction

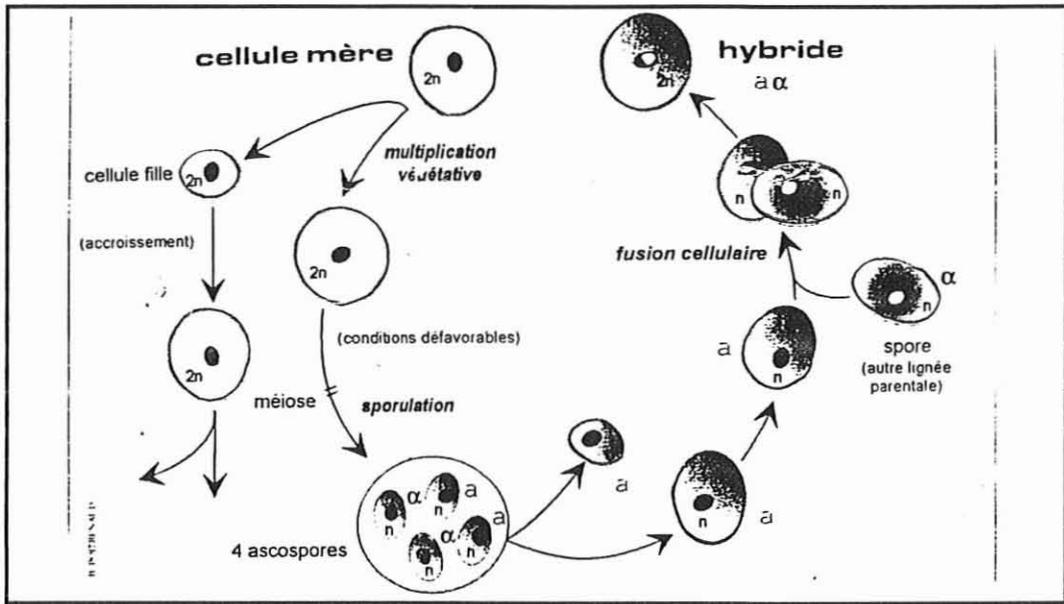


Fig.4 : Cycles de reproduction de la levure (37)

Les levures se reproduisent selon deux modes en général :

1. La **multiplication asexuée**, toujours présente, se fait essentiellement par bourgeonnement, (31, 38, 48) aux extrémités des grands axes des cellules si elles sont ovoïdes ou allongées (31), (et rarement par scissiparité). Il peut aussi être multilatéral, ce qui est une caractéristique de *Saccharomyces* et *Debaryomyces* (31, 48).

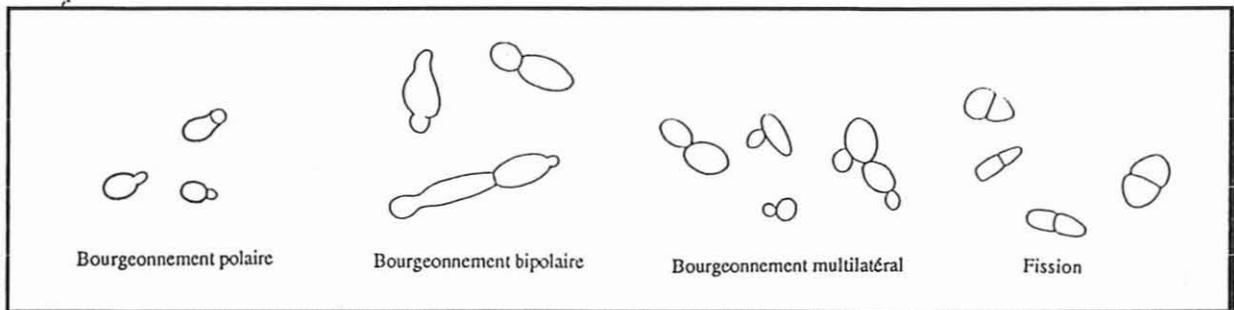


Fig.5 : Types de division (38, 52)

1. Bourgeonnement simple, polaire (*Saccharomyces*)
2. Bourgeonnement bipolaire (*Saccharomycodes*)
3. Bourgeonnement multilatéral
4. Scissiparité, fission (*Schizosaccharomyces*)

Sous sa forme la plus simple, le **thalle** est une cellule isolée mais les levures se présentent le plus souvent sous la forme de « pseudomycélium ». Certaines espèces peuvent produire un mycélium caractéristique de champignons filamenteux (genre *Trichosporon*) (10).

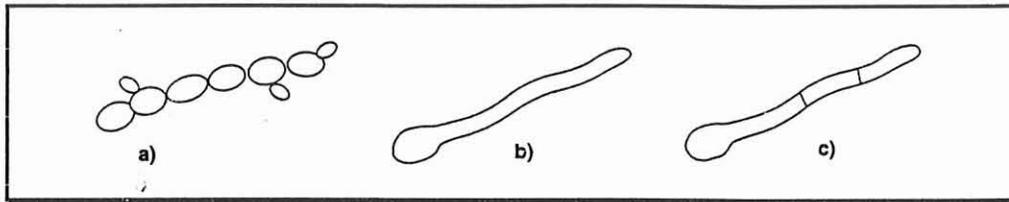


Fig.6 : **Filamentation des levures** (38)

- a. Pseudomycelium
- b. Vrai mycelium
- c. Vrai mycelium cloisonné

Lors d'un **bourgeonnement** (mode holoblastique), le noyau migre en périphérie, s'infiltré dans un point végétatif (bourgeon) et se sépare de la cellule mère en y laissant une cicatrice sous la forme d'un petit cratère, au niveau duquel les échanges avec le milieu extérieur sont inhibés. En fait, il semble que la cellule ne puisse réaliser plus de 25 bourgeonnements car, au delà, elle meurt par manque d'échanges avec le milieu (37, 23, 49). La cellule fille est plus petite (53).

Dans le cas de la division par scissiparité (scission binaire) (*Schizosaccharomyces* est le seul genre représentatif) (53), la cellule s'allonge, le noyau s'étire et se divise en deux. Une cloison apparaît et sépare la cellule mère en 2 cellules filles de taille égale, d'où une multiplication très lente (49, 53).

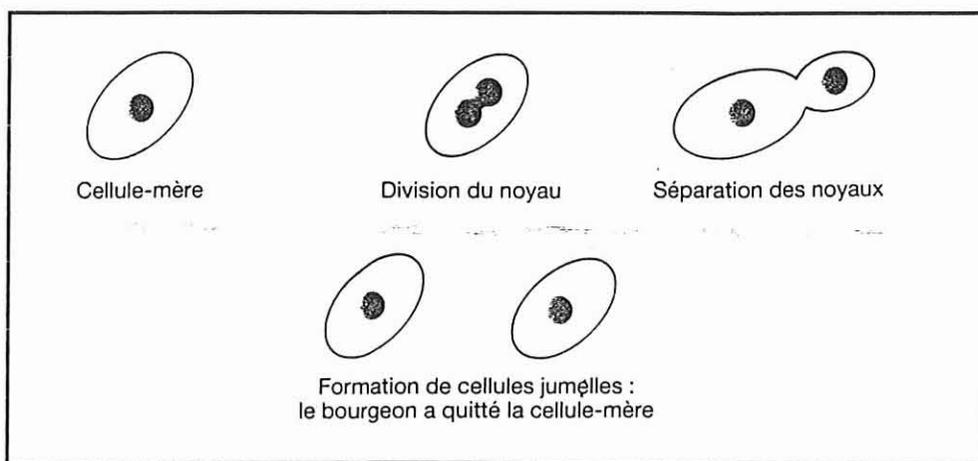


Fig. 7 : **Le bourgeonnement** (8)

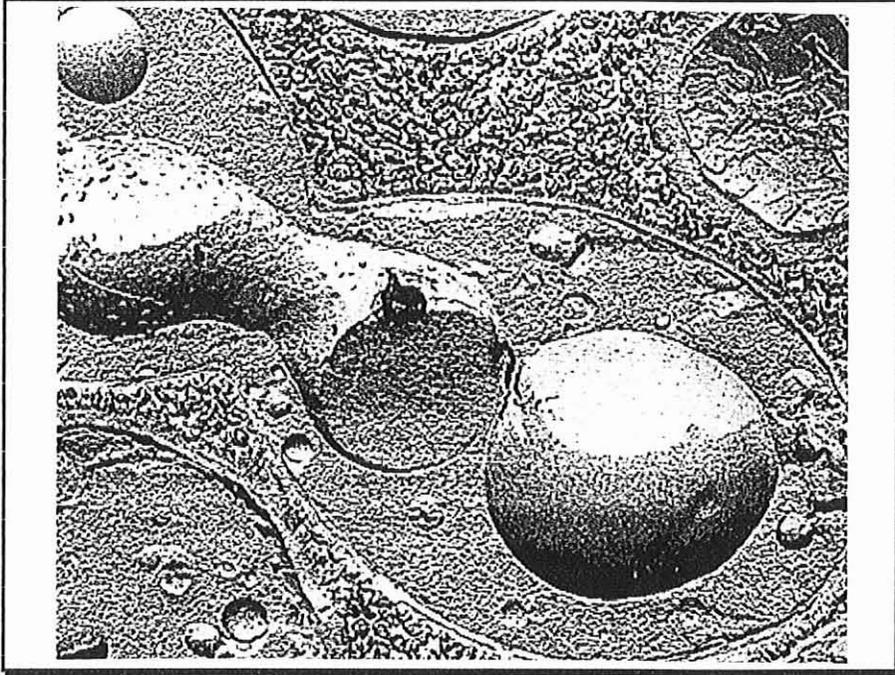


Photo. 2 : Cellule en cours de division (68)

2. La **reproduction sexuée** : dans un milieu défavorable (riche en acétate, pauvre en nutriments, températures extrêmes...) (48, 49), la cellule diploïde de levure va sporuler c'est à dire produire 4 ou 8 cellules haploïdes, nommées « ascospores » chez les Ascomycètes et « basidiospores » chez les Basidiomycètes, qui resteront en vie ralentie. Si les conditions du milieu redeviennent favorables, les spores sont libérées, vont germer, croître et commencer un nouveau cycle de multiplication végétative sous la forme haploïde (37) ou diploïde (23).

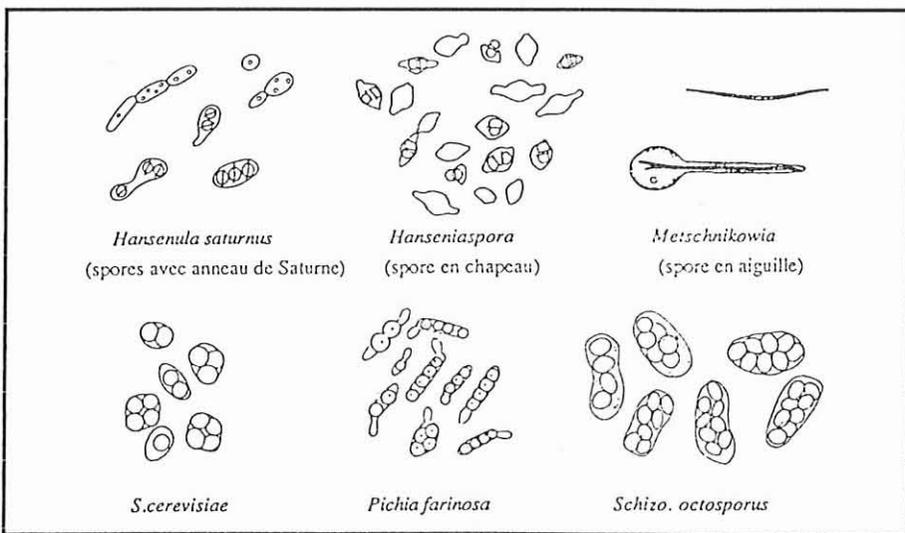


Fig. 8 : Asques et ascospores (52)

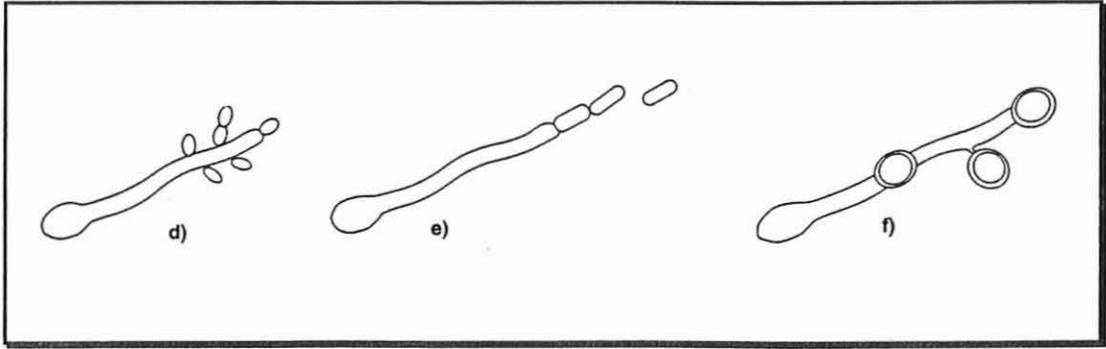


Fig. 9 :

- d. Mycelium avec blastospores
- e. Mycelium avec arthrospores
- f. Mycelium avec chlamydospores (38)

Les spores, sont plus riches en carbohydrates (glucanes, mannanes, tréhalose) et en lipides, à parois épaisses, mais plus pauvres en protéines et acides aminés que la cellule végétative. Elles sont bien adaptées aux périodes de dormance (23).

Les *chlamydospores*, produites par tout champignon dans des conditions défavorables, ont cependant une valeur systématique pour *Candida albicans* (52). Il peut également y avoir formation de *ballistospores* (spores projetées à maturité, produites sur des protubérances de la cellule mère), caractéristiques des *Sporobolomyces* (52).

La multiplication végétative permet une stabilité génétique alors que la reproduction sexuée favorise le brassage de gènes et l'adaptation de la cellule à son milieu (23). En effet, dans ce dernier cas, des spores porteuses de signes sexuels différents peuvent fusionner avec des spores d'une autre souche et mêler leurs chromosomes (37).

2. TAXONOMIE

La classification des levures évolue constamment : entre 1952, 1970 et 1984 (KREGER VAN RIJ), 1992 (COURTECUISSÉ et VAN HALLUWYN), près de la moitié des espèces ont changé de position ou de dénomination (49).

La dernière classification date de 1990. Elle a été réalisée par BARNEY et *al.* (30).

Quelques exemples de modifications :

Saccharomyces cerevisiae regroupe maintenant plusieurs espèces très anciennes de *Saccharomyces* devenus synonymes. Ainsi, *Saccharomyces carlbengensis* est devenu *S.uvarum* en 1970 (30, 57) ; il en est de même du couple *Kluyveromyces marxianus* / *K.fragilis* (30).

On remarquera aussi la fusion des genres *Torulopsis* et *Candida* (25).

Depuis 1984, *S.cerevisiae*, très utile en brasserie, englobe aussi bien les levures de fermentation haute que les levures de fermentation basse (37).

Il est souhaitable à l'avenir d'utiliser la nouvelle nomenclature proposée par BARNEY même si de nombreux industriels gardent par habitude les noms anciens (30).

Une autre espèce retiendra notre attention : *Geotrichum candidum*.

Sa position au sein du groupe des levures est couramment admise (ROSE et HARRISON, 1987– BARNEY et *al.* 1990). Cependant, certains auteurs continuent à classer les représentants du genre *Geotrichum* et des genres voisins (*Trichosporon*, *Endomyces*...) dans un groupe à part, celui des champignons levuriformes, intermédiaire entre les levures et les moisissures (40).

Les levures sont regroupées en 2 ou 3 grandes classes selon leur capacité ou non à élaborer des organes de reproduction sexuée (44, 10, 9). L'ensemble de ces 3 groupes constitue les **Eumycètes** (52). On les répartit en plusieurs niveaux : classe, ordre, famille, sous famille, genre, espèce (52).

Une espèce est définie comme une collection de clones (souches), étant donné que certains caractères (fermentation d'un sucre par exemple) peuvent varier pour des souches de même espèce (52).

Pour illustrer ceci, considérons la levure *Saccharomyces cerevisiae* :

Elle doit son nom de genre (*Saccharomyces*) à son affinité pour le saccharose, et son nom d'espèce (*cerevisiae*) à son rôle dans la fabrication de la bière (cervoise) (37).

Pour chaque espèce, on définit un ensemble de paramètres physiologiques et biochimiques : température de croissance, température optimale, pH optimum, assimilation de différents composés, éventuel pouvoir fermentaire, éventuel halotolérance, lipolyse, protéolyse à différentes températures (44).

ASCOMYCOTINA	
Hemiascomycètes => Endomycétales	
Spermophthoraceae	
<i>Metschnikowia</i>	
<i>Nematospora</i>	
Saccharomycetaceae => Lipomycetoideae	
<i>Lipomyces</i>	
=> Nadsonioideae	
<i>Hanseniaspora</i>	
<i>Nadsonia</i>	
<i>Saccharomyces</i>	
=> Saccharomycetoideae	
<i>Citeromyces</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Clavispora</i>	<i>Saccharomycopsis</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>Schwanniomyces</i>
<i>Hansenula</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<i>Pichia</i>	
BASIDIOMYCOTINA	
Ustomycètes => Spondiliales	
<i>Leucosporidium</i>	
<i>Rhodospidium</i>	
DEUTEROMYCOTA	
Blastomycètes => Sporobolomycetaceae	
<i>Bullera</i>	
<i>Sporobolomyces</i>	
=> Cryptococcaceae	
<i>Brettanomyces</i>	<i>Phaffia</i>
<i>Candida</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Sterigmatomyces</i>
<i>Kloeckera</i>	<i>Trichosporon</i>
<i>Malassezia</i>	<i>Trigonopsis</i>

Tab. 3 : **Classification des principaux genres de levure** (10)
d'après « Dictionary of the fungi », Ainsworth et Bisby's, 1995

* Les **Ascomycotina** ou « levures vraies » ou « levures ascosporegènes » : il y a formation d'endospores ou « ascospores » contenues dans un asque, par reproduction sexuée, après transformation d'une cellule par méiose (44, 10, 52, 49, 38).
Cette classe regroupe de nombreuses levures de fermentation ainsi que des levures d'altération (52).

* Les **Basidiomycotina** ou « levures fausses » sont parfois classées parmi les Deuteromycota (44). A l'issue d'une reproduction sexuée, sont formées des exospores ou « basidiospores » portées par une baside (52, 44, 10, 49).
Ce groupe comporte peu de levures capables de fermenter (52, 38).

* Les **Deuteromycota** ou « levures imparfaites » (« **fungi imperfecti** ») ou « levures asporogènes » sont des espèces ayant des affinités avec les Ascomycotina ou les Basidiomycotina, mais chez lesquelles le stade sexué (= stade parfait) n'est pas connu avant leur mise en culture sur un milieu adéquat permettant de les classer (9, 10, 52, 49). La multiplication est donc exclusivement asexuée (38). Ce groupe comprend des levures de fermentation et des levures pathogènes pour l'homme. Ex : *Candida* (52,49).

FORME PARFAITE (ASCOMYCÈTES)	FORME IMPARFAITE	FORME PARFAITE (BASIDIOMYCÈTES)
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	
<i>Dekkera intermedia</i>	<i>Brettanomyces intermedius</i>	
	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Filobasidiella neoformans</i>
	<i>Candida japonica</i>	<i>Filobasidium capsuligerum</i>
	<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	<i>Filobasidium uniguttulatum</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Kloeckera apis</i>	
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Kloeckera javanica</i>	
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Kloeckera corticis</i>	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Kloeckera japonica</i>	
<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Kloeckera africana</i>	
<i>Hansenula anomala</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	
<i>Hansenula bimundalis</i>	<i>Candida bimundalis</i>	
<i>Hansenula canadensis</i>	<i>Candida melinii</i>	
<i>Hansenula capsulata</i>	<i>Candida molischiana</i>	
<i>Hansenula fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	
<i>Hansenula holstii</i>	<i>Candida silvicola</i>	
<i>Hansenula jadinii</i>	<i>Candida utilis</i>	
<i>Hansenula syndowiorum</i>	<i>Candida nitrovorans</i>	
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Candida sorbosa</i>	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida krusei</i>	
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	<i>Candida dattila</i>	
	<i>Candida frigida</i>	<i>Leucosporidium frigidum</i>
	<i>Candida gelida</i>	<i>Leucosporidium gelidum</i>
	<i>Candida nivalis</i>	<i>Leucosporidium nivale</i>
	<i>Candida scottii</i>	<i>Leucosporidium scottii</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	<i>Candida reukaufii</i>	
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>	
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Candida valida</i>	
<i>Pichia norvegensis</i>	<i>Candida norvegensis</i>	
	<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Rhodosporidium dactyloides</i>
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodosporidium rhodovatum</i>
	<i>Cryptococcus infirmo-miniatus</i>	<i>Rhodosporidium infirmominiatum</i>
	<i>Rhodotorula yrominis</i>	<i>Rhodosporidium washingtonellum</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>	
<i>Saccharomyces telluris</i>	<i>Candida pintolopesii</i>	
<i>Saccharomycopsis lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>	
	<i>Sporobolomyces shibatanus</i>	<i>Sporidiobolus parvovaseus</i>
	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
<i>Stephanocascus ciferrii</i>	<i>Candida ciferrii</i>	
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	

Tab. 4 : **Forme parfaite (téléomorphe) et imparfaite (anamorphe) de quelques levures** (10)

Il faut préciser que sont toujours mentionnées dans la classe des Deutéromycètes, des levures pour lesquelles le stade parfait est maintenant connu et, bien souvent, était déjà décrit sous un autre nom d'espèce. Il s'agit donc bien d'une entité levurienne (holomorphe), décrite sous 2 noms différents correspondant aux formes parfaites (téléomorphes) et imparfaites (anamorphes) (10).

3. BESOINS NUTRITIONNELS

La croissance est une période d'interactions entre la cellule et l'environnement qui apporte les éléments nécessaires et qui est modifié par le métabolisme des cellules (52).

Le milieu doit apporter ce qui compose la biomasse des levures, c'est à dire :

$CH_{1.72} O_{0.44} N_{0.15}$ pour *Saccharomyces cerevisiae* (NAGAI 1979) + 10 % de cendres (52).

Les exigences nutritionnelles peuvent varier sur un plan quantitatif selon qu'on demande à la levure de fermenter ou de se multiplier végétativement pour produire de la biomasse (37, 23).

Elles sont hétérotrophes pour le carbone, saprophytes et quelquefois parasites (10).

ELEMENT CHIMIQUE	INTERVENTION DANS LA CONSTITUTION:	ROLE DE L'ELEMENT	PROVENANCE, SOURCE
Hydrogène, Oxygène	des composés organiques et de l'eau	- l'O ₂ est nécessaire pour le développement - la croissance est accélérée avec l'air tandis que la consommation de sucre diminue	Eau, air
Carbone	des composés organiques	- source d'énergie - élément le plus abondant de la cellule (facteur limitant)	source organique (glucose, hydrocarbures ...etc...
Azote	des amino acides, des protéines,...	- synthèse de la matière vivante	azote minéral, NH ₄
Soufre	de quelques amino acides, protéines, coenzymes	- synthèse protéique quand présence d'un groupement sulfhydrile	SO ₄
Phosphore	d'acides nucléiques, coenzymes, phospholipides	- indispensable à toute activité cellulaire. - une carence arrête la croissance et la multiplication cellulaire, l'activité fermentaire est peu touchée	PO ₄ (de K et de NH ₄)
Sels minéraux	souvent ce sont des cofacteurs de réactions enzymatiques	- le sort du magnésium est associé à celui du phosphore - la levure peut se passer de calcium mais par sa présence les réactions biochimiques se font plus rapidement - le fer et le cuivre ont un rôle dans le fonctionnement des enzymes respiratoires	sous forme d'ions

Tab. 5 : Besoins élémentaires des levures (23)

3.1. Besoins en carbone (glucides)

Le carbone constitue 50 % du poids sec de la levure (52). Les composés carbonés sont à la fois une source d'énergie, de carbone et d'hydrogène. Les levures ont besoin de glucides mais elles peuvent également en produire (tréhalose, glycogène) (9).

La capacité des levures à utiliser les sucres varie.

Les plus fréquemment utilisés sont : des sucres simples (hexoses : glucose, galactose), des dissaccharides (saccharose, maltose, lactose) et des trisaccharides (raffinose), mais aussi des pentoses (fructose) et des polysaccharides (ils sont peu coûteux mais non métabolisés par toutes les levures), le D xylose, l'amidon, les dextrines (contenues dans le moût de bière par l'action du malt), alcools, hydrocarbures (52, 48, 23, 9).

De nombreuses levures sont capables d'utiliser le D glucose, le D fructose et le D mannose (10, 9), mais certaines ne fermentent aucun sucre : les espèces des genres *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, ainsi que quelques *Candida* et *Torulopsis* (48).

Les levures poussant sur alcanes se trouvent essentiellement dans le genre *Candida* (*C.tropicalis*) (52, 48). Aucune n'est capable d'oxyder le méthane, ce qui n'est pas le cas du méthanol. (52) Parmi celles qui peuvent utiliser des alcools de faible poids moléculaire, on mentionnera : *Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia pinus* (52, 48).

<i>Candida boidinii</i>	<i>Pichia halophila</i>	<i>Hansenula capsulata</i>
<i>C. methanolica</i>	<i>P. methanolica</i>	<i>H. glycozyma</i>
<i>C. methylica</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>H. henricci</i>
	<i>P. pinus</i>	<i>H. minuta</i>
	<i>P. threalophila</i>	<i>H. polymorpha</i>

Tab. 6 : **Levures métabolisant le méthanol** (58).

La croissance sur éthanol n'est possible qu'en l'absence de glucose qui inhibe deux enzymes cytoplasmiques intervenant dans le métabolisme. La concentration en éthanol doit être suffisamment élevée pour la production de biomasse mais pas trop pour éviter un blocage par accumulation d'acétate (52).

En boulangerie, dans la pâte, l'apport est réalisé sous forme de sucres simples pré existants de la farine (glucose, fructose, saccharose...), le maltose, les sucres ajoutés (saccharose de mélasse de betterave ou de canne issues des industries sucrières, sucres invertis, sirop de glucose ou de fructose). Faute d'enzymes, *Saccharomyces cerevisiae*, la levure type de boulangerie ne peut utiliser le lactose (37, 23).

Le glucose est l'aliment préférentiel de cette espèce (37).

D-Glucose	Trehalose
D-Galactose	Raffinose
Mannose	Maltotriose
Fructose	Déoxyribose
Saccharose	D-Mannitol
Maltose	Ethanol
Melibiose	D-Glucitol
Melezitose	Acide lactique

Tab.7 : **Composés carbonés utilisables par *S.cerevisiae*** (52, 37)

- L'**amidon** : il est intéressant car il est abondant dans la nature mais une hydrolyse enzymatique préalable est nécessaire car certaines souches (*Saccharomyces cerevisiae*) en sont incapables (c'est le même problème pour les dextrines). Certaines levures secrètent des amylases (*Saccharomyces diastaticus*) mais celles-ci ne rompent pas toutes les liaisons de l'amidon ; cette espèce est par ailleurs sensible à la répression catabolique par le glucose. Les enzymes produites par la levure elle-même permettent de réduire la quantité d'enzymes apportées lors du pré-traitement.

Objectif : obtenir une souche capable de réaliser une hydrolyse et la fermentation, donc qui sécréterait une α amylase et une gluco-amylase avec une activité débranchante pour hydrolyser totalement l'amylose et l'amylopectine en glucose. C'est le cas de certaines souches de *Schwanniomyces* (52),

- Le **maltose** : il provient de la dégradation de l'amidon par les α et β amylases. Il est scindé en 2 glucoses par la maltase intracellulaire. Il pénètre dans la cellule par la malto perméase. Toutes les souches de levure n'ont pas la même aptitude à fermenter le maltose. Certaines, utilisées aux USA et Japon, possèdent une malto perméase et une maltase « adaptatives », c'est à dire qu'elles ne sont produites par la cellule que lorsque le glucose est épuisé, ce dernier étant responsable d'une répression catabolique (37). D'autre part, elles sont induites par le maltose. En Europe, ces 2 enzymes sont « constitutives » dans la plupart des cas et permettent d'utiliser ce substrat en présence ou en absence de glucose (37).

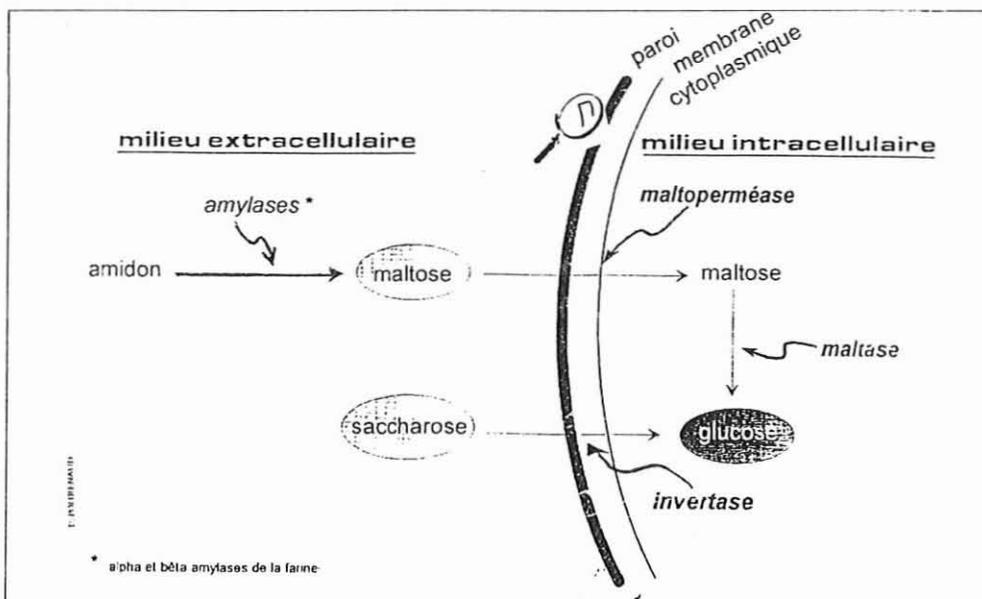


Fig. 10 : **Métabolisme du maltose** (37).

- La **cellulose** : très peu de levures sont cellulolytiques. Cependant de nombreuses souches peuvent utiliser le cellobiose (52),

- Le **xylose** : certaines levures le fermentent (52).

Beaucoup d'espèces de *Saccharomyces* haploïdes, de *Torulopsis* et de *Candida* peuvent produire de fortes quantités d'alcool (48).

De même, les hydrates de carbone peuvent être sécrétés en cas de limitation en azote, soufre ou phosphate (9).

Par la gluconéogenèse, les levures peuvent utiliser des composés carbonés autres que les glucides pour se développer, parmi lesquels : éthanol, glycérol, acide lactique pour *Saccharomyces cerevisiae*. Les levures peuvent reconsumer l'éthanol produit au cours de la fermentation alcoolique, s'il y a de l'oxygène dans le milieu et qu'il n'y a plus de sucres disponibles (52, 37).

3.2. Besoins en azote

L'azote est le 2^{ème} constituant (quantitativement) apporté par le milieu (52). Il compose 65 % de la matière sèche (49).

La présence d'azote, sous forme organique ou non, est indispensable lors de la multiplication (48, 49).

Il peut être apporté sous 2 formes :

- **minérale** : toutes les levures sont capables d'utiliser l'azote sous forme d'ion ammonium (chlorure, nitrate, phosphate, mais surtout sulfate qui est le composé idéal puisqu'il apporte également du soufre nécessaire à la synthèse de certains acides aminés) (52).

Certaines levures dégradent les nitrites et les nitrates (52).

Les nitrites sont peu utilisés comme source d'azote et peuvent devenir toxiques s'ils s'accumulent dans le milieu, notamment à pH < 6 par accumulation d'acide nitreux.

Les nitrates, par contre, sont réduits en nitrites puis en ammonium assimilable.

Quatre genres d'Ascomycotina utilisent le nitrate : *Citeromyces*, *Hansenula*, *Pachysolen*, *Wickerhamella*. Ce n'est pas le cas de : *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces* et *Schizosaccharomyces* (48).

- **organique** : les acides aminés des protéines et l'urée.

Si les grosses protéines ne peuvent être utilisées directement, les produits de dégradation (Aa) sont parfaitement assimilés (49). Plusieurs espèces ont un pouvoir protéolytique (10).

La croissance est plus rapide s'il existe des acides aminés, de préférence en mélange, ou des sels d'ammonium plutôt que des peptides (37, 9, 52).

Si plusieurs sources d'azote sont disponibles, la levure va consommer préférentiellement la « meilleure » : pénétration rapide, peu d'étapes de transformation, pas d'effet toxique. Elle l'utilisera pour la synthèse de ses acides aminés, des nucléotides et des vitamines (52).

En fin de fermentation, la levure excrète des matières azotées : acides aminés, polypeptides, purines, vitamines. Cette excrétion, qui peut-être due à l'autolyse des cellules, provoque un « goût de levure » et des troubles colloïdaux. La cellule élimine environ 1/3 de l'azote qu'elle avait assimilé qui lui, correspondait au 1/3 de l'azote de départ . Au total, elle assimile environ 50 % de l'azote du milieu (27).

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae* et *S.carlbergensis* notamment, ne peuvent utiliser la lysine comme seule source d'azote alors que beaucoup de levures « sauvages » le peuvent (10).

3.3. Besoins en lipides

Ils peuvent être indispensables pour la croissance : ainsi, *Pityrosporum ovale* a besoin d'acide palmitique.

D'ailleurs, de nombreuses espèces sont lipolytiques : *Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida lipolytica*, *C.melinii*, *C.rugosa*, *C.zeylanoides*, *C.magnoliae*, *C.versatilis*, *Leucosporidium scottii*, *Rhodotorula glutinis*, *R.rubra*, *Trichosporon pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Zygosaccharomyces baillii* (10, 48).

A l'opposé, des lipides extra-cellulaires et glycolipides sont formés par de nombreuses levures en culture aérée (*Lipomyces starkeyi*) (48).

Il existe des levures avec 20 % maximum de la M.S. de lipides (la moyenne étant de moins de 10 %). Entre 20 et 80 %, on parle de levures « oléagineuses » (52).

Certaines espèces ont des activités protéolytiques et lipolytiques concomitantes mais elles sont rarement importantes (38).

3.4. Minéraux, oligo-éléments et vitamines

Les minéraux ont un rôle plastique (pour l'édification des cellules), et fonctionnel (ce sont des facteurs de croissance) (49).

Les oligo-éléments (Al, Cr, Br, Cu, Pb, Mn, Ag, Sr, Tl, Zn, Sn...) ne sont peut être pas tous indispensables mais beaucoup sont, à très faible dose, des constituants essentiels des systèmes enzymatiques : le silicium est un constituant obligatoire de la membrane ; le manganèse, le zinc et le cuivre stimulent la croissance et la fermentation (49). Certains constituants sont produits par la cellule elle-même : inositol, acide nicotinamique, vitamines (52).

Etant données les interactions entre les différents composants, il faut calculer les quantités de chaque constituant pour obtenir un rendement optimal à une vitesse spécifique de production maximale. D'autre part, la toxicité du cuivre à forte dose est réduite en cas d'association au zinc (52).

3.4.1. phosphore

Source : dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4), ou hydrogénophosphate dissodique (Na_2HPO_4)

L'ion PO_4^{3-} régule la synthèse des lipides et des glucides. En conditions limitantes, la cellule synthétise une phosphatase acide appartenant à la paroi qui libère du phosphore à partir d'esters phosphoriques. Le phosphore est utilisé pour la synthèse des acides nucléiques, nucléosides di et triphosphates et polymères de polyphosphates (52). Il est intimement lié au mécanisme de la fermentation alcoolique (49).

3.4.2. soufre

Source : sulfate d'ammonium, méthionine, sulfites, thiosulfate

Le soufre est utilisé à 60 % dans les protéines, à 5 % sous forme de sulfate inorganique, et il participe à la formation d'acides aminés soufrés et de vitamines. La méthionine permet une croissance plus rapide qu'avec les ions sulfate (52).

3.4.3. potassium

C'est l'élément minéral quantitativement le plus important.

Source : phosphate mono et dipotassique (KH_2PO_4 ou K_2HPO_4)

Le potassium intervient dans les échanges avec les cations métalliques ; il stimule la respiration et la fermentation à $\text{pH} < 7$; c'est un effecteur de nombreuses enzymes ; enfin, il intervient dans la structure des ARN. La consommation est 2 fois plus grande en fermentation qu'en respiration (52).

3.4.4. magnésium

Source : sulfate ou chlorure de magnésium

Il active les multiples enzymes glycolytiques, stimule la synthèse des acides gras, régule les ATPases membranaires, participe avec K^+ à la pénétration du phosphate. Enfin, il est impliqué dans la structure des ribosomes, de la membrane cellulaire et des acides nucléiques. Une carence en fermentation alcoolique entraîne la formation d'acide acétique (52, 49).

3.4.5. calcium

Il n'est pas indispensable mais il stimule certaines levures telles que *Saccharomyces*. Il favorise l'intégrité cellulaire en environnement hostile et intervient dans la floculation (52).

3.4.6. zinc

Il a un rôle essentiel car c'est un co-facteur enzymatique indispensable dans la glycolyse. Il est nécessaire à la synthèse de vitamines (riboflavine), stimule l'action du magnésium et la pénétration du maltose et du maltotriose (52). La carence en traces de zinc réduit le pouvoir fermentaire de *Saccharomyces cerevisiae* (37).

3.4.7. manganèse

Il augmente le niveau d'azote, la synthèse protéique et la croissance (52).

3.4.8. autres : (souvent apportés par les impuretés des constituants de base)

- fer : il est contenu dans le site actif de certaines enzymes,
- baryum : en faible concentration, il favorise la croissance,
- chlorure : il serait nécessaire mais son rôle est inconnu,
- As, Pb, Al, Cr, Vanadium : ils jouent le rôle d'inhibiteurs,
- Na, Cu, Ni, I : sont nécessaires à l'état de traces

- ergostérol : il est synthétisé par les levures seulement en cas d'aérobiose. Il devient facteur de croissance en anaérobiose (52).

3.4.9. vitamines

Six vitamines du groupe B ont été identifiées comme étant des facteurs de croissance : biotine, acide panthoténique, inositol, thiamine (B₆), pyridoxine (B₆) et niacine (PP) (37).

On appelle « **facteur de croissance** », toute substance organique, apportée en petite quantité, dont la carence perturbe le métabolisme de la levure. Ce sont des métabolites essentiels : ils sont indispensables aux micro-organismes auxotrophes. Ils doivent leur être fournis car ils sont, pour la plupart, incapables de les synthétiser (49).

En leur absence, il n'y a pas fermentation ; quand ils sont épuisés, la fermentation s'arrête. Certains, ajoutés au moût du raisin, stimulent les levures, même si ces dernières sont capables de les synthétiser (49).

Les vitamines sont des facteurs de croissance proprement dits. Elles ont une structure identique ou très proche de celle de certaines coenzymes, c'est à dire de la partie active des enzymes (49).

La fermentation n'épuise pas le milieu en vitamines mais elle en remanie profondément la composition (49).

On peut distinguer :

- les levures *prototrophes*, capables de synthétiser tous les constituants nécessaires à partir de sources organiques variées. Elles peuvent donc se développer et fermenter en absence de facteurs de croissance car elles les synthétisent.

- les *auxotrophes* (*Kloeckera*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*) incapables de se multiplier s'il manque certains constituants, tels que les vitamines, dans le milieu (470).

Biotine = vitamine H

La plupart des *Saccharomyces* en ont besoin mais elle n'est indispensable à aucune espèce car toutes peuvent la synthétiser (49, 52).

Pyridoxine = vitamine B₆ = adermine

C'est une coenzyme, stimulant efficace des levures, notamment *Saccharomyces fructum*, *Kluyveromyces*, *Torulopsis*, qui y réagissent fortement. La levure compense une carence par une formation plus grande de thiamine (49). Elle intervient dans le métabolisme des acides aminés, des glucides et des acides nucléiques (52).

Thiamine = vitamine B₁ = aneurine

Elle agit sur la plupart des levures en augmentant davantage la vitesse de fermentation que la croissance. C'est un facteur très important pour le métabolisme respiratoire, la glycolyse et la fermentation (52). Toutefois, *Kloeckera* se multiplie mal sans elle. Une addition au moût limite la production d'acide pyruvique (49).

Acide pantothénique

C'est un des plus puissants facteurs de croissance levurien. Son nom rappelle son omniprésence dans le règne vivant. Facteur principal de la croissance des levures, sa carence modifie profondément la formation de produits secondaires au cours de la fermentation alcoolique. Il commande en partie le taux d'acide acétique dans le milieu

fermenté. *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. chevalieri* et certaines *Kloeckera* ne le synthétisent pas. Quant aux levures prototrophes, elles le synthétisent toujours très difficilement. En son absence, elles s'appauvrissent en biotine, nicotinamide, pyridoxine tandis qu'elles accumulent davantage de mésoinositol, de riboflavine et de thiamine (49, 52).

Nicotinamide = vitamine PP = niacine

Elle est plus ou moins synthétisée par les levures selon l'espèce ; la plupart des souches apiculées en sont incapables et doivent la trouver dans le milieu (49).

L'acide nicotinique intervient dans la synthèse d'ATP (52).

Mésoinositol

C'est le 1^{er} facteur de croissance identifié chimiquement. Il est indispensable au développement de certaines espèces : *Kloeckera*, *Saccharomyces veronae*, *Torulopsis stellata*. Il joue le rôle d'activateur (49).

3.5. Besoins en eau

La plupart des levures nécessitent entre 90 et 95 % d'humidité relative, mais certaines peuvent se développer à moins de 65 % : ce sont les levures « osmophiles », rencontrées dans les moûts de raisin concentrés à 630 à 800 g de sucre/l : elles s'y développent en surface dans la zone humide (49).

L'influence de la pression osmotique et l'activité de l'eau sera évoqué ultérieurement.

4. UNE CELLULE, DEUX METABOLISMES

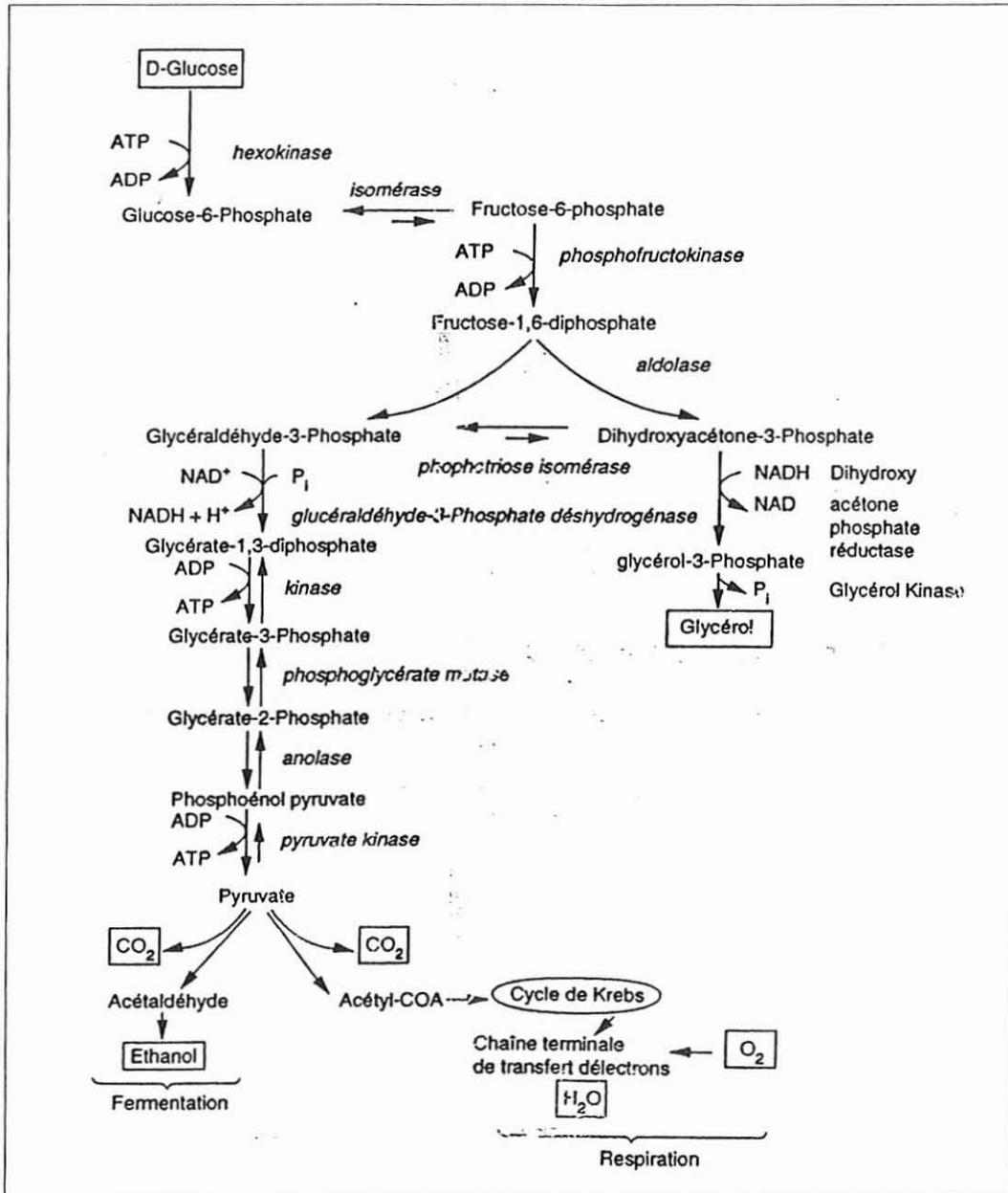


Fig.11 : Métabolisme aérobie (respiration) ou anaérobie (fermentation) du glucose (41)

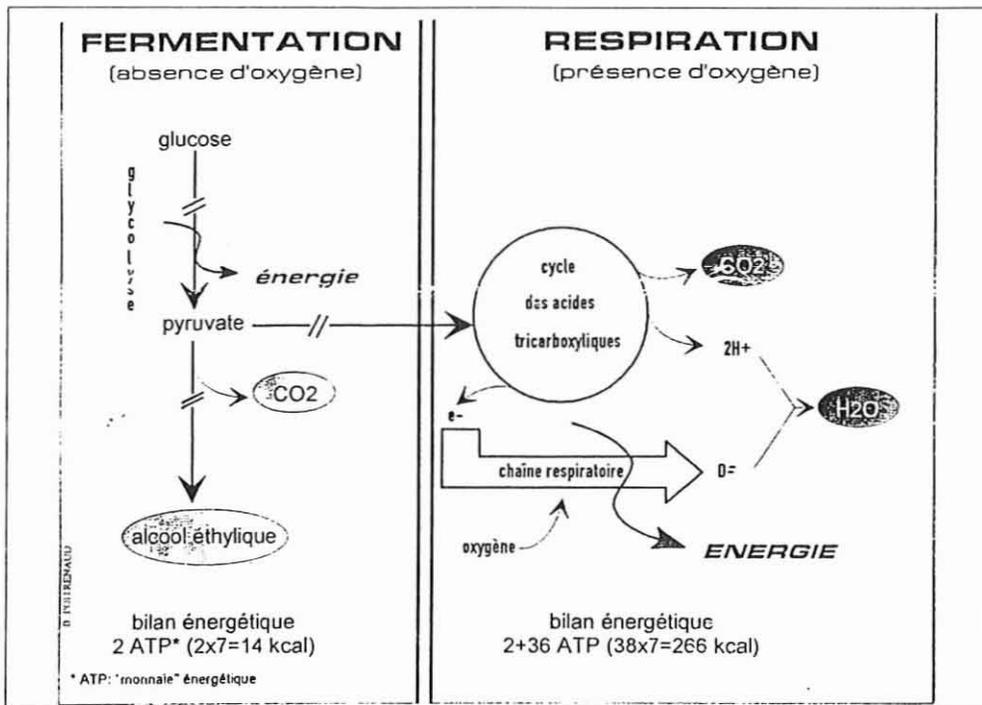


Fig.12 : Métabolisme énergétique de la levure (37)

4.1. Métabolisme en anaérobiose : la fermentation

4.1.1. Définition

L'oxydation du glucose est incomplète : on parle de fermentation ou de « vie sans air » (définition de Pasteur) (62).

La réaction qui se produit est la suivante :



On estime à 93 - 95 %, le glucose dégradé en CO₂ et éthanol et à 5 % le glucose servant à la formation de glycérol, d'acides organiques, d'aldéhydes, d'esters et d'alcools supérieurs, ainsi que la biomasse elle même (37, 23, 41).

L'alcool contient encore beaucoup d'énergie, donc seule une faible partie de l'énergie biochimique potentiellement présente dans le glucose a été libérée. Ceci permet à la levure de vivre mais pas de se multiplier (37).

Le métabolisme en anaérobiose porte le nom scientifique de « glycolyse » ou « voie d'Emden Meyerhof Parnas » (dégradation des glucides en pyruvate), qui fait intervenir 30 à 65 % des protéines cellulaires que constituent les enzymes. Le glucose, sucre à 6 atomes de carbone, pénètre dans la cellule où il subit des phosphorylations consommatrices d'énergie avant d'être scindé en 2 molécules à 3 atomes de carbone. Ces dernières entreront chacune dans une série de réactions aboutissant au pyruvate, qui, en l'absence d'oxygène, est transformé en acétaldéhyde puis en éthanol et sera ensuite excrété par la cellule (37, 75).

Un système de régulation permet aux levures de s'orienter soit vers la fermentation, soit vers la croissance. Ce système est sous la dépendance de 2 facteurs :

- **l'effet Pasteur**

Un grand nombre de levures peuvent métaboliser les sucres en aérobiose et en anaérobiose : la respiration permettant un meilleur rendement cellulaire, la consommation de sucre est moindre en aérobiose d'où une diminution de la fermentation. Cette inhibition de la fermentation par la respiration est appelée effet Pasteur. Il est variable selon les espèces et est d'autant plus marqué que les souches ont un important métabolisme respiratoire, telles que *Candida tropicalis* (52, 48, 65).

- **l'effet Crabtrée**, ou « répression catabolique », ou « contre effet Pasteur », ou « effet glucose »

Il y a répression catabolique de la synthèse de certaines enzymes du cycle de Krebs impliquées dans la respiration, par une concentration en glucose > 5 %. La conséquence est le développement d'une fermentation même en aérobiose totale. Il en résulte une diminution de la biomasse produite et de la consommation en oxygène, une accumulation d'éthanol, d'où l'apport limité progressif par les industriels du sucre lors de la production de biomasse (52, 48, 9, 65, 37, 23).

Dans le vin, il existe une relation étroite entre la multiplication des levures et la fermentation des sucres : pour se développer, les levures de vin réalisent des synthèses nécessitant de l'énergie qu'elles obtiennent par la fermentation du glucose. Croissance et fermentation sont donc indispensables. Tout arrêt de croissance est suivi dans un court délai, d'un arrêt de la fermentation (49).

4.1.2. Métabolites formés au cours de la fermentation (49)

- **éthanol** : l'alcool produit paralyse les levures, réduit puis stoppe l'assimilation azotée. La fermentation s'arrête définitivement à partir d'un certain degré alcoolique, variable selon l'espèce de levure utilisée (9). C'est ainsi que les boissons alcoolisées produites n'excèdent jamais un certain degré d'alcool (13 % d'alcool/vol) (62).

On appelle « **tolérance à l'éthanol** » la concentration d'éthanol qui arrête la croissance après 72 h d'incubation à 30°C (ROSE-1980). Elle est plus élevée pour les levures de distillerie que pour les levures de brasserie (9).

La multiplication des levures, la diminution de l'azote du moût et la fermentation du sucre, sont directement liés à la quantité d'azote fournie aux levures. Plus le moût est aéré, plus la croissance augmente et la décomposition du sucre est rapide, et donc plus la fermentation démarre vite et est complète... d'où l'obtention d'un degré alcoolique élevé (49).

- **alcool pyruvique et acétaldéhyde** : ce sont des activateurs de la fermentation

- **CO₂**, dont l'effet inhibiteur sur la croissance est surtout réel dans le cas des fermentations sous pression et lorsque CO₂ a atteint la saturation. Si on l'extrait par pompe à vide, la fermentation n'est qu'à peine activée. A 7,2 atm, il interrompt la croissance des levures. A 30 atm, il arrête la fermentation alcoolique. L'avantage principal des cuves sous pression est l'obtention d'un meilleur rendement en alcool/g de sucre fermenté (9).

- **stérols** : ergostérol, zymostérol... et les acides gras insaturés à longue chaîne. Ils ont 2 rôles : constituants cellulaires indispensables, supports enzymatiques et facteurs de perméabilité cellulaire. Ce sont des facteurs de croissance anaérobie des levures.

4.1.3. Différents types de fermentation

♦ Fermentation alcoolique

Essentiellement assurée par *Saccharomyces*, elle est utilisée pour la fabrication du vin, de la bière, du cidre et de diverses boissons fermentées. Non seulement elle est indispensable à la formation d'éthanol mais elle forme également des composés organoleptiques. La teneur en alcool assure la stabilité du produit dans des conditions de stockage appropriées. De nombreux sucres sont fermentescibles en éthanol par la levure, ce qui est utilisé pour la production d'éthanol industriel, et envisagé pour la production de carburants à partir de déchets ou de produits agricoles. On l'utilise aussi en boulangerie mais dans ce cas, c'est CO₂ le composé essentiellement produit et qui fait lever la pâte. La fermentation alcoolique est l'apanage des levures, peu celle des bactéries (*Zygomonas*) (38).

♦ Fermentation lactique

Elle est essentiellement bactérienne.

En fromagerie, les levures interviennent après la fermentation lactique au cours de l'affinage ; elles sont responsables de la formation du caillé par lipolyse et protéolyse, ainsi que de l'ouverture des fromages de type Emmenthal par production de CO₂ (38).

♦ Fermentation acétique

Elle est le propre des *Acetobacter* (bactérie) dans la fabrication du vinaigre.

Cette fermentation peut être favorisée par la présence de levures qui, en oxydant l'éthanol, donc en réduisant sa concentration (« mère du vinaigre ») permettent aux bactéries acétiques d'agir. Ces dernières sont inhibées si la concentration en éthanol est trop importante (38).

Exceptée la fermentation alcoolique qui vise à la production particulière d'une substance, les autres types de fermentation remplissent 2 fonctions dans l'alimentation :

- conserver (acide lactique surtout)
- donner du goût (62).

4.1.4. Produits secondaires issus de la fermentation alcoolique : les composés organoleptiques

Au terme des réactions de fermentation, les levures rejettent du CO₂ et des composés organiques qu'elles ne peuvent dégrader davantage (aldéhydes...) (62).

Les composés organoleptiques confèrent la saveur aux produits fermentés. Leurs seuils de perception influent autant que la concentration : un composé avec un seuil de perception bas peut avoir un rôle important sur la saveur même en très faible quantité (52).

Propanol	odeur irritante
Acétate d'éthyle	fruité - ananas
Méthyl 2 propanol	alcoolisé
Butanol	irritant
Acétate de propyle	fruité - poire/framboise
Acétate d'isobutyle	fruité/floral - poire/jacinthe
Méthyl 3 butanol 1	fruité/floral - alcoolisé
Butyrate d'éthyle	fruité - ananas
Acétate d'isoamyle	fruité - poire/banane
Valérate d'éthyle	fruité/pomme
Caproate d'éthyle	fruité - ananas/banane
Phényl éthanol	floral - rose
Caproate d'éthyle	fruité - cognac/raisin

Tab.8 : **Produits aromatiques des levures** (9)

a. Alcools supérieurs

Environ 45 alcools supérieurs (plus de 2 atomes de carbone) ont été identifiés dans la bière. Les plus importants : éthanol, n-propanol, isobutanol, 2-méthyl-1-butanol, 2-méthyl-1-butanol, phényl-éthanol.

Les alcools supérieurs (alcools isopropylique et isoamylique), les alcools terpéniques (linalol, géranol, nérol, terpinéol...) sont responsables du « bouquet secondaire » du vin (50).

Ils sont souvent dérivés du catabolisme des acides aminés :

Valine => isobutanol
Leucine => 2 méthyl butanol (= alcool isoamylique)
Isoleucine => 2 méthyl butanol
Phénylalanine => 2 phényl éthanol

Néanmoins, ils peuvent également provenir de leur anabolisme.

L'apport d'acide aminé spécifique peut augmenter leur synthèse, de même que l'addition d'azote. Leur formation augmente aussi si l'on ajoute du glucose ou du saccharose ou si l'on remplace le maltose par du saccharose, si on élève la température ou l'oxygénation ; ceci dépend tout de même de la souche (52, 49).

Le glycérol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) est essentiellement formé en début de fermentation. Sa saveur sucrée contribue à donner du moelleux au vin. Sa douceur et sa viscosité ont un effet prononcé sur la flaveur des vins, en particulier, il donne ce que les œnologues appellent le « corps » (49).

b. Acides organiques

On en trouve environ 50 dans les boissons fermentées. Ils ont un rôle direct sur la flaveur et le pH.

♦ L'**acide acétique** (CH_3COOH), est un constituant essentiel de l'acidité volatile des vins. Provenant essentiellement d'une fermentation bactérienne, un excès peut donc indiquer une altération bactérienne : la « piqûre acétique » qui rend le vin inconsommable (49),

- ◆ L'acide succinique ($\text{COOH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), est formé en faible quantité par les levures mais il est très stable au cours de la fermentation et de la conservation. Sa saveur, un mélange de goûts acides, salés et amers, confère aux boissons fermentés, leur goût spécifique (49),
- ◆ L'acide lactique ($\text{CH}_2\text{-CHOH-COOH}$) est en partie (peu) produit par les levures au cours de la fermentation alcoolique (49),
- ◆ acides isobutyrique, isovalérique, α céto glutarique, malique,
- ◆ acide citrique (*Brettanomyces*) (38)
- ◆ acides gras : acides caproïque, caprilique, caprique (52).

c. Esters

Ex : acétate d'éthyle, acétate d'isoamyle, acétate de propyle.

Ils résultent de l'action d'un acide sur un alcool.

L'acétate d'éthyle est le plus abondant dans les boissons fermentées mais le seuil de détection est important ; il n'est donc pas dominant dans la saveur des boissons. Cependant, il donne un goût piqué même à faible dose (52, 49).

Il faut distinguer les esters biochimiques formés pendant la fermentation alcoolique, des esters chimiques, élaborés au cours du vieillissement (49).

d. Aldéhydes et cétones

Il en existe plus de 200 dans les boissons fermentées.

La plupart sont réduits en alcools mais un excès peut être excrété. D'ailleurs, ceux correspondant à la plupart des alcools formés par la levure sont détectés dans les boissons. Il existe des aldéhydes à chaîne longue qui confèrent une saveur amère et des aldéhydes à chaîne courte responsables d'une saveur fraîche et fruitée. Ceux produits pendant l'oxydation (et non la fermentation) ont une grande importance sur la saveur des boissons.

Lors de la fabrication de la bière, dans la 2^{ème} phase de la fermentation, les aldéhydes sont réabsorbés, réduits ou oxydés par une levure (si elle est encore fonctionnelle), donc la concentration finale d'une boisson en aldéhydes résulte d'un équilibre entre ceux qui sont formés en début de fermentation et ceux qui sont utilisés en fin de fermentation.

Le plus important est l'acétaldéhyde. D'autres, la 2,2 butane-dione (diacétyle) et la 2,2 pentane-dione ont des seuils de perception faibles et des arômes de beurre perçus comme des défauts si la quantité est trop importante, notamment dans la bière, les vins blancs et les rhums légers (52).

L'éthanal (CH_3CHO), ou aldéhyde acétique ou acétaldéhyde, peut produire une altération des vins appelée « fleur », altération causée par *Candida vini* (49).

e. Composés soufrés

La plupart ne provient pas directement du métabolisme de la levure mais de la combinaison entre des composés soufrés des matières premières et des métabolites.

Les principaux composés formés par la levure :

- dioxyde de soufre (SO_2), hydrogène sulfuré (H_2S), à partir de la voie de synthèse de la cystéine et de la méthionine

- diméthyl sulfure (DMS)

Leur production augmente :

- ◆ en cas d'autolyse des cellules car les acides aminés soufrés libérés sont dégradés
- ◆ si la concentration en ions sulfate augmente (52).

f. Terpènes

Ex : Citronellol, linalol, geraniol (*Kluyveromyces lactis*).

L'addition de geraniol entraîne sa transformation en citronellol. La synthèse augmente par apport d'asparagine comme source d'azote ou en cas d'élévation de température.

Dans le champagne, il y a relargage de C et Z farnesol au cours de l'autolyse des levures (52).

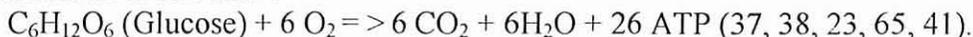
g. Lactones

Le 4 décanolide et le cis 6 dodecen-4-olide, confèrent des arômes de pêche (52).

4.2. Métabolisme en aérobiose : respiration ou « voie oxydative »

Il s'agit d'une oxydation complète du glucose (37, 62).

La réaction est la suivante :



Il se forme donc 13 fois plus d'ATP que par métabolisme anaérobie (8, 23, 41).

Toute l'énergie biochimique potentielle contenue dans le glucose étant libérée, la levure peut, non seulement assurer son maintien en vie, mais aussi synthétiser de la matière organique donc entrer en croissance et se multiplier (pour peu que les autres éléments nutritifs soient présents en quantité adéquate).

La respiration fait intervenir de nombreuses enzymes mitochondriales.

Cette fois, le pyruvate, en présence d'oxygène, sera transformé en acétyl coenzyme A qui permettra l'entrée dans un cycle de dégradation des acides tricarboxyliques (« **cycle de Krebs** »).

Durant ce cycle, il y a oxydation totale de l'acétyl coenzyme A en CO_2 , libérant des transporteurs d'électrons réduits (NADH, $FADH_2$) qui sont ensuite ré-oxydés par la **chaîne respiratoire** avec production de H_2O et d'énergie.

La chaîne respiratoire, dont le rendement énergétique est beaucoup plus efficace, est préférentiellement utilisé par la levure. Néanmoins, cette préférence est limitée par l'effet Crabtree (37).

On oppose « fermentation » et « assimilation » en réservant ce terme à l'utilisation d'un substrat par la voie oxydative. Toutes les espèces possèdent la voie oxydative et utilisent toutes le glucose (38).

4.3. Types métaboliques

Selon la voie empruntée, on peut diviser les levures en 2 groupes :

- les **aérobies strictes** : leur métabolisme est exclusivement respiratoire et elles sont incapables d'utiliser le glucose en l'absence d'oxygène (*Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Lipomyces*, *Saccharomycopsis*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Candida famata*, *Pichia fluxuum*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula canadensis*...) (52, 75),
- les **aéro-anaérobies facultatives**, qui regroupent la plupart des levures (52).

Dans ce dernier cas on distingue deux sous-catégories :

1. Levures de **type respiratoire**,
2. Levures de **type fermentaire** (75).

En règle générale, un composé fermenté (en anaérobie) peut aussi être oxydé (en aérobie) (48).

Cette distinction entre les types fermentaires et respiratoires ne s'applique qu'à la croissance en aérobose sur glucose, fructose et mannose car les autres sucres interviennent dans des répressions enzymatiques (52, 75).

	Type respiratoire	Type fermentaire
	Levures préférant un métabolisme respiratoire en aérobose	Levures préférant un métabolisme fermentaire même en aérobose
Utilisation du glucose en aérobose	< 30 %	> 90 %
Transformation totale du glucose en :	CO ₂ et H ₂ O	éthanol
Rendement énergétique	élevé	faible
Utilisation du glucose dans la synthèse de biomasse	peu	importante
Exemples	La majorité des levures	<i>Saccharomyces</i> , <i>Schizosaccharomyces</i> , <i>Brettanomyces</i> , et certaines espèces de <i>Candida</i> et <i>Kloeckera</i>

Tab.9 : Comparaison des deux types métaboliques (52, 9, 75)

Comme tous les organismes qui ont à leur disposition plusieurs modes de production d'énergie, les levures font appel de préférence à la respiration aérobie quand l'oxygène est disponible, car ce type de respiration est plus efficace sur le plan du rendement énergétique (62).

Pour *Saccharomyces cerevisiae*, la fermentation est la voie majoritaire à partir du glucose même en aérobose ; cela est dû à une répression de la respiration par le glucose (le galactose produit une répression moins importante) (52).

La croissance des levures en anaérobose n'a lieu que si les vitamines, les acides gras insaturés et l'ergostérol sont en quantité suffisantes car ils ne peuvent être synthétisés en l'absence d'oxygène (9).

Toutes les levures peuvent se développer en présence d'oxygène : il n'existe pas de levures anaérobies strictes (52).

4.4. Influence de l'environnement

Les levures sont en général acidophiles et mésophiles : elles se multiplient à des pH compris entre 3 et 7,5 et à des températures voisines de 25-28°C (38).

4.4.1. Température

La température optimale de croissance se situe vers 20-25°C mais elle peut osciller de 5 à 30, voire 37°C, et différer de la température courante de culture. Parfois, la multiplication végétative a encore lieu vers 0°C, et même légèrement en dessous mais le taux de croissance est faible (genres *Debaryomyces* et *Rhodotorula*).

Les levures ne sont pas aussi tolérantes que les bactéries aux températures élevées (52, 10, 31).

	Température de croissance minimale	Température de croissance optimale	Température de croissance maximale
Levure psychrophile	5°C voire 0-1°C	< 15°C voire +1°C	< 20°C
Levure psychrophile facultatif = psychrotrophe	jusqu'à 0°C	20-30°C	35°C
Levure mésophile	15-20°C voire 0°C	20-45°C	< 45°C
Levure thermophile	45°C	55-65°C voire 45°C	> 100°C

Tab.10 : Exigences de température des levures (52, 61, 31, 10, 48)

Quelques définitions

- micro-organismes **psychrophiles** : ils sont facilement isolés dans les eaux et les sols de l'Arctique ou l'Antarctique. Comme 90 % des océans ont une température inférieure ou égale à 5°C, ils constituent un habitat immense. Ces micro-organismes s'adaptent à leur environnement : leurs enzymes, systèmes de transports et mécanismes de synthèse protéique fonctionnent bien à basse température. Leurs membranes cellulaires restent semi-fluides dans le froid grâce à leur teneur élevée en acides gras insaturés. Beaucoup d'entre eux commencent à perdre leurs constituants cellulaires à 25-30°C par altérations de leur membrane cellulaire (52, 61).

Il existe peu de levures de ce type (52).

- les levures **psychrophiles facultatives**, ou **psychrotrophes** : elles sont nombreuses et responsables de la détérioration de la nourriture réfrigérée (61).

Plus la température de croissance est basse et plus le taux d'acides gras insaturés de la membrane plasmique est important, plus la membrane est fluide à basse température (52).

- les **mésophiles** : cette catégorie, très peuplée, regroupe notamment tous les agents pathogènes humains, vu que leur environnement se situe à une température assez constante de 37°C (61).

- les **thermophiles** : seuls certains mycètes appartiennent à cette classe qui comporte essentiellement des bactéries (52, 61). Ces organismes prospèrent dans le compost, les meules de foin, conduites d'eau chaude et sources chaudes. Elles diffèrent des mésophiles car leurs enzymes sont beaucoup plus stables à la chaleur et les systèmes de synthèse protéique, capables de fonctionner à des températures élevées. En outre, leurs lipides membranaires sont plus saturés et ont des points de fusion plus élevés ; ainsi les membranes des thermophiles restent intactes à des températures élevées (61).

ex : *Cyniclomyces guttulatus*, *Saccharomyces telluris*, *Torulopsis bovina*, *T. pintolopensis*... (48).

On définit la « **thermorésistance** » comme le traitement thermique maximal que la levure est susceptible de supporter. Elle diffère s'il s'agit d'une chaleur sèche ou humide. La plus grande thermorésistance se retrouve chez *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri*, puis *S. baillii* et *S. uvarum* (49).

La destruction des levures non « thermorésistantes » commence à 52°C; les cellules en phase de croissance exponentielle sont plus sensibles qu'en phase stationnaire, et la mortalité est maximale en début de bourgeonnement (52).

Une élévation de la température **au-dessus** de la température maximale de croissance entraîne l'arrêt de la synthèse de certaines protéines tandis que d'autres, spécifiques, sont produites (52).

Un choc thermique entraînerait une synthèse de protéines spécifiques, une thermotolérance, et une tolérance à l'éthanol (52).

Les levures sont selon l'espèce plus ou moins résistantes à la **congélation** et à la **lyophilisation**. On peut donc conserver certaines souches par ces procédés (52).

∴ Elles peuvent d'ailleurs supporter sans inconvénients des températures basses à l'état de spores (-200°C) (49).

La température est un facteur prépondérant pour la vie des cultures. Elles ne se développent bien que dans une échelle de température couvrant au plus 20°C. Au dessous de 13-14°C, le départ spontané d'une **fermentation** est quasi impossible. Hors, lorsqu'un moût ne fermente pas après 4 à 6 jours, il est colonisé par des moisissures et d'autres agents d'altération qui se développent en surface. Seul le levurage peut déclencher la fermentation, éventuellement un réchauffement. Au dessus de 35°C, les levures cessent leur activité. D'ailleurs, elles meurent parfois dès 30 à 32°C. Au delà de 40-45°C et en présence d'alcool, elles sont tuées en quelques minutes : c'est le principe de la stérilisation par chauffage ou stérilisation (49).

Seules certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de fermenter à basse température. En Suisse, on a isolé 2 souches fermentant à moins de 0°C (49).

On définit la « **température critique** » des levures comme la température au-dessus de laquelle elles ne se reproduisent plus et meurent en provoquant le ralentissement puis l'arrêt de la fermentation (49). La température idéale pour une vinification en rouge se situe entre 26 et 30°C ; elle résulte d'un compromis entre la nécessité d'obtenir une fermentation assez rapide, une bonne macération et éviter l'arrêt de la fermentation par un excès de température (c'est à dire 30 à 32°C dans les régions tempérées, moins dans les régions chaudes). La température des cuves augmentant progressivement en raison du dégagement calorifique issu de la fermentation, un système de refroidissement est nécessaire (49).

La température solaire aurait un pouvoir inhibiteur sur le développement des levures ; cet effet serait dû aux UV qui ont des propriétés bactéricides et dont l'utilisation pour stériliser le vin est interdite (49).

4.4.2. pH

La croissance est bonne à pH 7-8, l'optimum se situant souvent entre 4,5 et 6,5 mais beaucoup tolèrent de grandes variations. La plupart des levures peuvent se développer à pH= 3,0 et certaines tolèrent mieux des pH très acides (comme tous les champignons), voisins de 1,5 : *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula rubra*, *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces ballii*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus*, *S. rosei*, *Trichosporon fermentans*, *Zygosaccharomyces rouxii* (47, 31, 48).

Les *Torulopsis* préfèrent des pH voisins de 2,8-3 (10).

En dessous de pH=5,5, elles entrent facilement en compétition avec les bactéries. Alors qu'elles supportent la plupart des acides organiques rencontrés dans les aliments, les levures sont fortement inhibées par les acides acétique et lactique (10, 31, 47).

4.4.3. Pression osmotique et activité de l'eau

L' « **activité de l'eau** », abrégée « **aw** » est le rapport de la pression osmotique (PO) de vapeur d'eau du milieu sur la pression d'eau distillée à la même température. C'est donc l'état d'équilibre qui s'établit entre l'atmosphère et le produit.

$0,80 < aw < 0,91$ permet d'inhiber la plupart des levures.

Plus une levure est osmophile, plus l'aw doit être bas pour inhiber son développement. Les produits alimentaires se conserveront d'autant mieux que leur aw est basse (48).

La plupart des souches ne peuvent se développer que pour des aw > 0,80 mais certaines tolèrent des PO plus élevées, correspondant à aw = 0,60 à 0,70 mais avec un métabolisme lent. Ce sont des levures « **xérotolérantes** » ou « **osmotolérantes** ».

La plus xérotolérante est *Saccharomyces rouxii* mais on retrouve aussi dans cette catégorie : *Zygosaccharomyces bisporus*, *Z.rouxii*, *Z.baillii*, *Torulopsis candida*, *T.versatilis*, *T.etchellsii*, *Candida krusei*, *C.sake*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.stellata*, *Hansenula anomala*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Pichia pastoris*, *P.burtonii*,

P.farinosa, *P.membranaefaciens*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S.pombe*, *Torulasporea delbrueckii*, *Debaryomyces hansenii*... (52, 10, 38, 48).

La température influe également sur la tolérance à la PO.

<i>aw</i>	<i>Bactéries</i>	<i>Levures</i>
0.98	<i>Clostridium botulinum A</i> <i>Pseudomonas</i>	-
0.97	<i>Clostridium botulinum E</i>	-
0.96	<i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>	-
0.95	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Clostridium</i> <i>botulinum B</i> et <i>Cl. perfringens</i> <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>	-
0.94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Microbacterium</i> <i>Pediococcus</i> , <i>Streptococcus</i> <i>Vibrio</i>	-
0.93	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>	-
0.92	-	<i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>
0.91	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> (anaérobie) <i>Streptococcus</i>	-
0.90	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Hansenula</i> , <i>Saccharomyces</i>
0.88	-	<i>Candida</i> <i>Debaryomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i>
0.87	-	<i>Debaryomyces</i>
0.86	<i>Staphylococcus</i> (aérobie)	-
0.80	-	<i>Saccharomyces</i>
0.75	Bactérie halophile	
0.70	-	-
0.62	-	<i>Saccharomyces</i>

Tab.11 : Aw minimale permettant la croissance des micro-organismes (48)

Mécanisme : la levure résiste à des milieux de faible aw en accumulant des polyols (glycérol, arabinol) pour minimiser la différence de PO entre la cellule et le milieu. La concentration en éthanol et la PO sont liées lors d'une fermentation alcoolique. En effet, l'excrétion d'éthanol est freinée par une PO élevée et l'éthanol dans la cellule est toxique (52, 48).

Une augmentation de la PO est néfaste pour les levures (49).

4.4.4. Pression atmosphérique

En empêchant le dégagement de CO₂, elle est nuisible à la multiplication des levures : cette propriété est utilisée pour la conservation des jus de raisins (8 atm) (49).

4.4.5. Oxygène

Comme évoqué précédemment, toute levure peut se développer en présence d'oxygène. Cependant, quelques espèces orientent leur métabolisme vers la fermentation même en présence d'oxygène (*Candida* et *Kluyveromyces*) (52).

4.4.6. Agents chimiques

Les acides

Les levures tolèrent de larges gammes de pH (2,4 à 8,6 en théorie) car les enveloppes cellulaires sont imperméables aux ions H⁺ et OH⁻. Par contre, l'acide non dissocié (RCOOH) peut pénétrer et inhiber la cellule par un mécanisme encore mal connu. La croissance s'arrête mais la cellule semble continuer à respirer et à fermenter. La toxicité des acides dépend donc du pH, seul responsable de la forme ionisée ou non (52).

L'éthanol

Toutes les levures ne présentent pas la même sensibilité à l'éthanol. Les plus résistantes appartiennent à l'espèce *Saccharomyces*, d'où un emploi dans la fermentation alcoolique et dans la production industrielle d'éthanol. La tolérance à l'éthanol dépend de la composition en acides gras des membranes : elle augmente si la culture a lieu en présence d'acide linoléique (au lieu d'acide oléique), d'ergostérol (au lieu de campostérol) car la meilleure fluidité de la membrane due aux acides gras insaturés améliore l'excrétion de l'alcool : il est éliminé moins vite qu'il n'est produit et la viabilité des cultures croît en améliorant son excrétion (52).

Les sulfites (SO₂)

Plus le pH est bas, plus la production de sulfites est importante.



L'équilibre est déplacé vers la production de SO₂ à pH bas, SO₂ étant le plus actif contre les micro-organismes. Les plus résistantes : *Zygosaccharomyces baillii* et *Brettanomyces* (52).

Les antibiotiques

Les plus souvent testés sont : cycloheximide (actidione), nystatine, amphotéricine et chloramphénicol (52).

Les levures sont insensibles aux antibiotiques généralement utilisés en alimentation ou thérapeutique animales (3).

Les antiseptiques

Les produits tuant les levures sont dits « fongicides ». D'autres produits paralysent simplement la croissance et empêchent le bourgeonnement. Ils peuvent n'être actifs que sur les cultures non proliférantes : ce sont des « fongistatiques ». Un même produit peut être fongistatique à faible dose, et fongicide à forte dose (49).

L'emploi des antiseptiques est strictement réglementé, notamment en vinification :

1. **anhydride sulfureux** : à dose suffisante, il inhibe complètement les levures mais à plus faible dose, il stimule la transformation du sucre. A dose bien choisie, il gêne davantage la multiplication des levures peu alcoologènes (apiculées, *Torulopsis*, *Candida*) que celles des levures elliptiques, actives, qu'il favorise. Il provoque également une sélection levures/bactéries, les bactéries étant, à doses égales, beaucoup plus sensibles (49).

Ces nombreuses propriétés en font un produit de vinification indispensable et pratiquement irremplaçable. Cependant, il peut, à doses trop élevées, retarder ou empêcher la fermentation malolactique et conduire ainsi à des vins ayant une acidité fixe trop élevée. Il peut également être à l'origine de goûts sulfhydriques. Il est cependant facile d'éviter ces accidents par l'utilisation de doses convenables (49).

2. **acide sorbique** : autorisé à 200 mg/l dans les vins (49).

Présentation rapide de l'emploi des levures

HISTORIQUE

Dès avant Jésus Christ, l'homme produisait du vin, de la cervoise et du pain. Voici quelques dates relatives à la connaissance et à l'utilisation des levures :

- **1665** : un boulanger parisien ajoute de la levure de bière récupérée à la pâte à pain.
- **1680** : grâce à l'invention du microscope par Anton Van Leeuwenhock, la première observation de « globules » dans la bière en fermentation est faite.
- **1835** : Cagnard de Latour identifie les levures.
- **1857** : Pasteur découvre le mécanisme des fermentations et la spécificité des organismes propres à chaque type de fermentation. Privés d'oxygène, ils peuvent vivre et croître en substituant la fermentation alcoolique à la respiration.
- **1872** : Fould Springer, déjà présent en Autriche, crée à Alfort la 1^{ère} usine de levure de panification en France. Il s'agit de la première culture industrielle de micro-organismes sur divers substrats.
- **1896** : Alfa Laval met au point un séparateur centrifuge à buses facilitant la récolte des levures dans un milieu liquide.
- **1914** : en raison des problèmes de disette liés à la première Guerre Mondiale, Max Delbruck développe à Berlin des procédés semi-industriels de culture de levure de bière. Le point de départ de la consommation de levures-aliment se situe en Allemagne.
- **1931** : la récolte et le séchage de levures de bière sont mis au point à Strasbourg par la société Vitalevor.
- durant la **Seconde Guerre Mondiale**, les levures-aliment sont à nouveau utilisées en Allemagne.
- **1950** : mise en route de l'unité de production de levure aliment à la distillerie de Steen dans le nord de la France.
- **1955** : les fromageries Bel réalisent la culture des « levures lactiques » sur lactosérum et la production de levures aliment s'étend en Europe.
- dès le début des années **1960**, de nombreux travaux de recherche aboutissent à la mise au point de techniques de production de levure à partir de produits pétroliers.
- après **1965**, compte tenu de sa supériorité nutritionnelle, la production de levure continue à se développer et ce malgré la concurrence d'autres sources de protéines (32, 74).

DEFINITIONS

Globalement, il existe 2 grandes catégories de levures :

- Levures vivantes :

Levures ferments provoquant une fermentation alcoolique en milieu anaérobie. Elles sont utilisées en panification, brasserie, œnologie, distillerie (32, 74).

Levures pharmaceutiques : la levure officinale retenue par le Codex est la levure de bière, *Saccharomyces cerevisiae* (32, 74).

- Levures mortes :

Levures aliment

Elles sont cultivées en aérobiose, puis séchées et **tuées**, par traitement thermique qui permet non seulement de détruire son pouvoir fermentaire mais aussi d'augmenter sa digestibilité (32, 65, 74). Une levure aliment idéale ne fermente pas et donne un bon rendement protéique avec un métabolisme exclusivement respiratoire des substrats carbonés et un métabolisme fermentaire faible, sans effet glucose (52).

Ex : *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomycopsis*...
Saccharomyces cerevisiae est mal adaptée (52).

Les levures-aliment sont des Protéines d'Organismes Unicellulaires (P.O.U.), ou Single Cell Protein (S.C.P.)

Nées au cours des années 1960 lors de la mise au point des cultures de levure sur hydrocarbure, elles peuvent être obtenues à partir de levures mais aussi de bactéries, moisissures ou algues (spirulines) (32).

Ce sont des biomasses traitées et/ou deshydratées, plus que des protéines. Leur teneur en protéines varie de 20 % (moisissures) à 80 % (bactéries) et leur richesse en lysine les rapproche des protéines animales. Elles sont utilisées dans 2 buts distincts :

- en alimentation animale pour remplacer progressivement le soja
- en alimentation humaine comme supplément protéique (58).

L'intérêt des levures pour la production des P.O.U. est multiple :

- séparation facile du milieu de culture par filtration,
- toxicité rare,
- développement à un pH sélectif empêchant la croissance d'autres micro-organismes,
- richesse en vitamines et acides aminés indispensables, surtout en lysine (32).

Levures-aliment et probiotiques

Les levures-aliment ont une « action probiotique » mais ce ne sont pas des « probiotiques » à proprement parler. A ce titre, rappelons que les probiotiques sont des organismes **vivants** (ce qui n'est pas le cas des levures-aliment), qui, à l'inverse des antibiotiques, favorisent la croissance d'autres micro-organismes chez l'hôte et permettent d'améliorer, entre autre, les performances zootechniques des animaux.

La réduction progressive des antibiotiques comme promoteurs de croissance a suscité un regain d'intérêt pour l'incorporation de telles souches dans l'alimentation, afin de maintenir l'effet bénéfique obtenu (72).

PARTIE II

Chapitre I

LES

BOISSONS

ALCOOLISEES

1. La bière
2. Le vin
3. Le champagne
4. Le cidre
5. Le saké
6. Les boissons distillées

1. LA BIÈRE

D'origine très ancienne (Sumériens, 7 000 ans avant J.-C.), la bière était fondamentalement une boisson fermentée à base de céréales, voire de pain humide. L'histoire offre des preuves de sa consommation à Babylone, en Mésopotamie, en Egypte. Les Celtes auraient contribué à son amélioration en utilisant des grains maltés. La « cervoise », boisson nationale des Gaulois, le resta même après l'occupation romaine qui développa pourtant la consommation du vin ; sa fabrication domestique incombait aux femmes, tout comme la cuisson du pain.

Les brasseries artisanales apparurent vers le X^{ème} siècle en Normandie, en Alsace, dans les Flandres et dans diverses autres régions d'Europe. L'ajout de plantes amères aromatiques (houblon) remonte au VIII^{ème} siècle en Bavière. Le houblon s'impose au XIV^{ème} alors que le terme de « bière » se substitue à celui de « cervoise aromatisée au houblon ».

L'industrialisation de la fabrication est apparue au XIX^{ème} siècle et l'industrie du froid collabore à partir de 1860.

La fermentation haute réalisée à température moyenne a été progressivement abandonnée vers 1830 en Allemagne, lorsqu'on a observé que la fermentation gagnait à être réalisée à basse température (10°C).

L'inoculation du moût a également subi une innovation importante car les moûts successifs étaient inoculés avec le levain récolté à la fin de la fermentation précédente, sans que l'on connaisse réellement sa nature ni sa fonction. La première culture pure de levure a été introduite au moût de brasserie en 1883 par Emil Christian Hansen, ce qui a permis la production industrielle que nous connaissons aujourd'hui (9, 45, 62).

La bière est pratiquement la seule boisson fermentée réalisée à partir de céréales : orge, blé et riz (12, 61, 64).

;

1.1. DEFINITION

La bière est obtenue par fermentation alcoolique d'un moût (jus sucré) fabriqué par macération de malt d'orge (38).

La fermentation est obtenue spontanément (bière belge du type gueuze) par *Saccharomyces cerevisiae*, *S.pastorianus*, *S.carlbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*... ou le plus souvent par **ensemencement massif** du moût stérile par des souches pures sélectionnées et conservées par repiquage : levures de fermentation haute ou basse. Elles transforment les sucres en éthanol en 2 étapes : la fermentation principale (90%) puis la fermentation de garde (38). L'épuisement des glucides fermentescibles a lieu dans un ordre précis :

glucose => fructose => maltose => maltotriose (45).

N.B. : Même si *S.cerevisiae* et *S.uvarum* sont actuellement considérées comme une même espèce (*S.cerevisiae*), on continue de les différencier en brasserie puisqu'elles diffèrent par l'aptitude à utiliser le mélibiose) (38, 45, 41, 64).

1.2. CLASSIFICATION LEGALE FRANCAISE (13)

Appellation	Degré alcoolique
Bière sans alcool	< 1,2°
Bière légère	1,2 à 2,9°
Bière bock, de table	2,8 à 3,4°
Bière de luxe	4 à 5°
Bière spéciale	>5°

Tab.12 : Degré alcoolique de différents types de bières

Au sein de cette classification se déclinent plusieurs types précis :

Dénomination	Degré alcoolique
Blanche	4,4 à 7,7°
Blonde de type « pils »	4,4 à 5,5°
Blonde spéciale	5,5°
Ambrée	4,4 à 8°
Brune	4,5 à 8°

Tab.13 : Autre classification des bières

Type de fermentation	Caractères généraux	Noms de marques
Fermentation haute, bières hautes, « ale »	Très riche en esters : goûts fruités et complexes	Ale caramel, Ale d'origine (Real Ale), Alt, Bitter, Blanche, Brown Ale, De Garde, Double, d'Epices, Kolsch, Mild Ale, Old Ale, Pale Ale d'origine (influence britannique), Pale Ale, Porter, Saison, Scotch, Stout, Triple, Vin d'Orge, brune des Flandres, rouge des Flandres, Weisse, Weisen
Fermentation basse, bières basses, « lager »	Peu d'esters : douces et moëlleuses	Blonde française, Bock, Dortmunder, Double Bock, Eisbock, Lager d'origine, de Mars, Marzen, Pils belge, Pilsener d'origine, Rauch, Vienna, Munich,
Fermentation spontanée « lambic » (nom populaire)	Peu amères mais très acides	Faro, Fruit lambic (nommez le fruit), Gueuse
Bières hybrides		Triple épicée, Black an tan (Porter ou Stout + Lager d'origine), Steam (Ale fermentée avec une levure basse)...

Tab.14 : Archétypes classiques de classification non officielle (67, 42)

On pourra enfin trouver d'autres dénominations :

- **Bières de régime ou basses calories** : leur contenu alcoolique est identique à celui d'une bière normale mais elles sont 25% moins caloriques, 75% moins riches en glucides, 45% moins riches en bases puriques. Leur faible teneur en glucides est obtenue avec *Saccharomyces diastaticus*, apte à fermenter les dextrines et même l'amidon (9, 62).

Elles sont obtenues par transformation des dextrines (qui constituent 20% des glucides du moût) en glucose sous l'effet d'une glucoamylase. Le glucose est ensuite fermenté en alcool. Une souche capable de synthétiser sa propre amylase entraînerait une réduction des coûts de production. Une telle souche existe déjà mais les glucoamylases ayant une température optimale de 55-65°C, elles ne sont pas toujours inactivées par la pasteurisation conduite à 60-62°C. La bière devient alors trop sucrée au cours du stockage en raison de la libération de glucose à partir des dextrines résiduelles. On utilise alors des glucoamylases d'origine fongique : *Aspergillus awamori*, *A.niger*, *Rhizopus sp.*(41).

- **Bières « light » ou légères** : elles ont 40% d'alcool de moins, 35% de calories et autant de sucres en moins.
- **Boissons maltées ou « bières sans alcool »**. Avec 10 % de calories supplémentaires par rapport à une bière normale, 250 % de sucres en plus, 60 % de purines en moins.

C'est vers 1985 que sont apparues en France les bières dites « sans alcool », dont la teneur en éthanol n'est pas nulle mais ne doit pas excéder 1,2° (Loi Evin du 10/01/1991). Elles peuvent être produites selon 2 techniques :

- ♦ la plus courante consiste à arrêter la fermentation par un refroidissement
- ♦ et moins souvent par « osmose inverse » qui consiste à filtrer sur membrane la majorité des molécules d'éthanol (19).

Alors qu'il est facile de réduire la quantité d'alcool quant il s'agit de passer de 4,5 à 2,5° d'alcool, il est très difficile d'atteindre une valeur inférieure à 0,5°.

On emploie des levures spéciales qui utilisent uniquement les hexoses type fructose, glucose, saccharose, mais qui ne fermentent ni le maltose, ni le maltotriose. Mändl 1977, Haehn 1938, Brenner 1980, Steiner 1987...ont décrit la fabrication de bières à faible teneur en alcool avec des souches de *Saccharomyces ludwigii* : elle ne fermente pas le lactose, et par une fermentation lente, donne des bières à environ 0,35° d'alcool. Si cette fermentation est trop lente, on mélange le moût à des levures normales et on veille à maintenir son acidité.

De même, par le choix des matières premières et d'une méthode de brassage, il est possible d'ajuster le profil glucidique de façon à obtenir un taux d'éthanol faible.

La bière obtenue est peu différente d'une bière standard mais elle doit être constamment pasteurisée car les sucres fermentescibles restants sont dangereux pour une bonne stabilité microbiologique (27, 57).

Cette fabrication peut nécessiter le recours aux levures immobilisées qui sont encapsulées dans une matrice en alginate de calcium. Le moût froid et les levures encapsulées sont placées dans une colonne. Selon la température, le type de levure et les dimensions de la colonne, la production d'alcool est limitée par la masse cellulaire. Cette technique est peu coûteuse mais il reste de gros résidus non fermentés d'où la nécessité de surveiller attentivement l'état microbiologique (27).

	Bière « sans alcool »	Bière à 5°
Dextrines	24 g/l	27 g/l
Maltose	32 g/l	13 g/l
Valeur énergétique	27 kcal/100ml	34 kcal/100ml
Minéraux	variable	variable
Vitamines	constante	constante

Tab.15 : Composition d'une bière sans alcool versus une bière à 5° (19)

- **Bières cooler** : boisson à base de bière, sans en préciser le type, mélangé à un sirop de sucre aromatisé ou à un jus de fruit, carbonaté et pouvant contenir un antioxydant mais pas de conservateur en France. Sa teneur en alcool est généralement inférieure à 1% en volume (42).
- **Bières légères**
De tous temps, elles ont existé sous forme de bières de table ou de bières de nourrice (vendues en pharmacie), ces dernières étant préconisées en raison de leur potentiel lactogène qui serait dû à un β glucane (42, 19, 28).

1.3. CONSOMMATION (41, 9, 45, 62, 12) *Voir figures 13, 14 et 15*

La consommation de bière est très variable d'un pays à l'autre et dans un même pays. Elle n'est pas exclusivement nordique et dépasse de beaucoup celle du vin, sauf dans des pays de tradition vinicole comme la France. Il apparaît d'une manière générale que les gros consommateurs de bière sont de faibles consommateurs de vin et inversement (23, 28).

C'est la 3^{ème} boisson consommée après l'eau et le vin en France. En 1997, la consommation n'était que de 37 litres/habitant français, soit 4 fois moins qu'en République Tchèque (13, 12, 28).

La préférence du consommateur français se tourne vers les bières de luxe et les bières spéciales (28).

1.4. PRODUCTION *Voir figures 16, 17, 18, 19*

En 1997, la France exporte 2,1 millions d'hl de bière vers l'Europe essentiellement alors qu'elle en importe 4,3.

Sa production s'élève à 19,5 millions d'hl en 1997 contre 450 millions/an pour l'Europe (28).

Le type de bière le plus répandu dans le monde est la bière blonde de type « pils » de fermentation basse avec une teneur en alcool de 3,8 à 4,4 g/100g (45).

Le Royaume-Uni fabrique une majorité de bières de fermentation haute (environ 43 000 000 hl). Cependant, les Anglais se sont habitués aux bières basses. Les bières hautes sont également fabriquées dans quelques brasseries belges, françaises, et ce sont d'ailleurs des « bières spéciales » (Bière d'abbayes par exemple) (65).

La France compte une vingtaine de brasseries. Kronenbourg est le 1^{er} brasseur français avec plus de 30 marques et son usine de Champigneulle produit ¼ de la production. La France compte un peu plus de 200 variétés différentes (13, 41, 12).

Même si l'Alsace et le Nord Pas de Calais prédominent, quasiment toutes les régions françaises produisent ou interviennent dans la production de la bière (13, 12). Cependant, la France est loin d'être parmi les plus gros producteurs (28).

Fig.13 : Consommation de bière en 1997 (28)

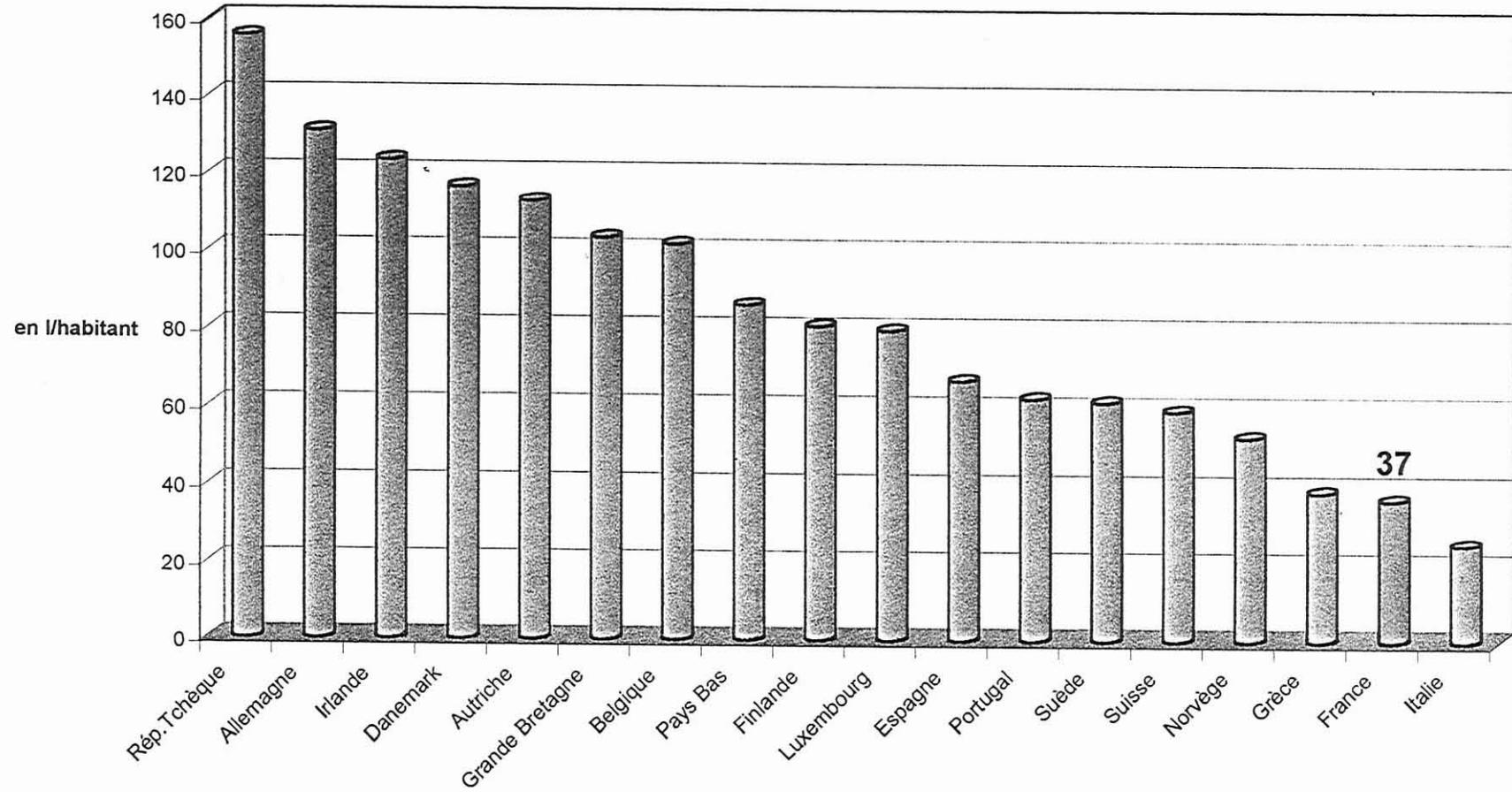


Fig.14 : Consommation de diverses boissons en France en 1993 (28)

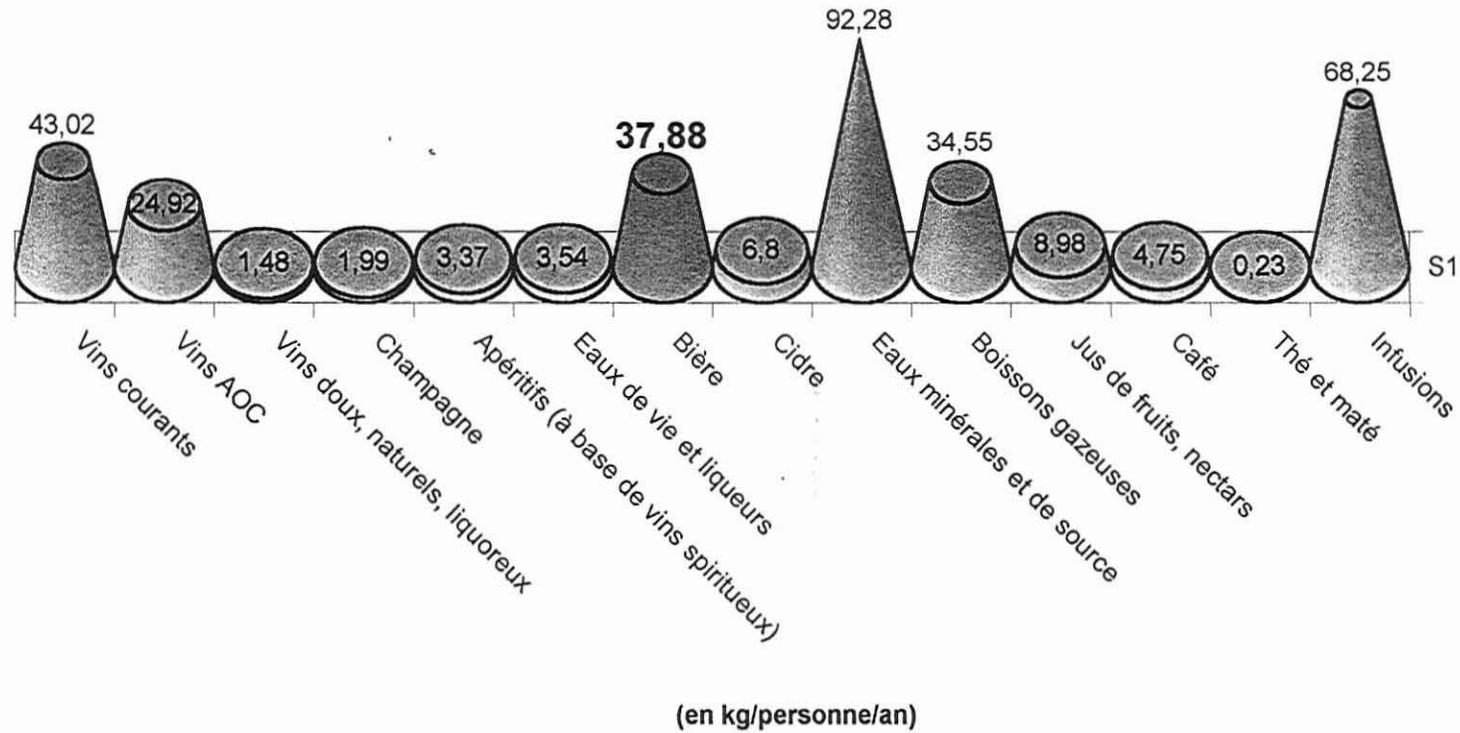
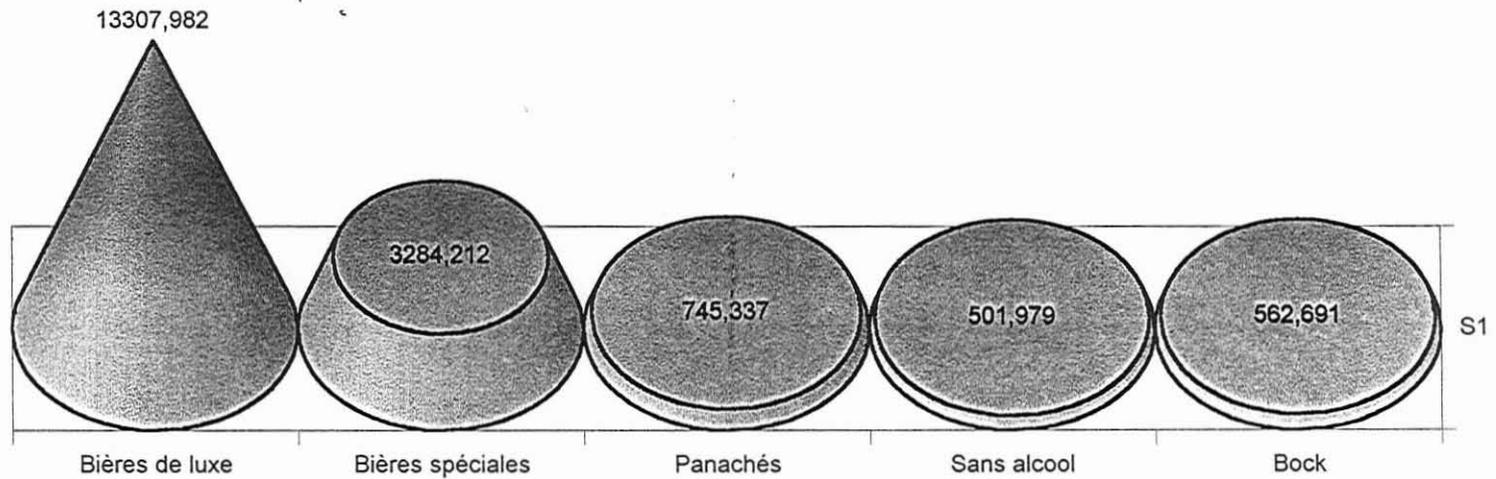
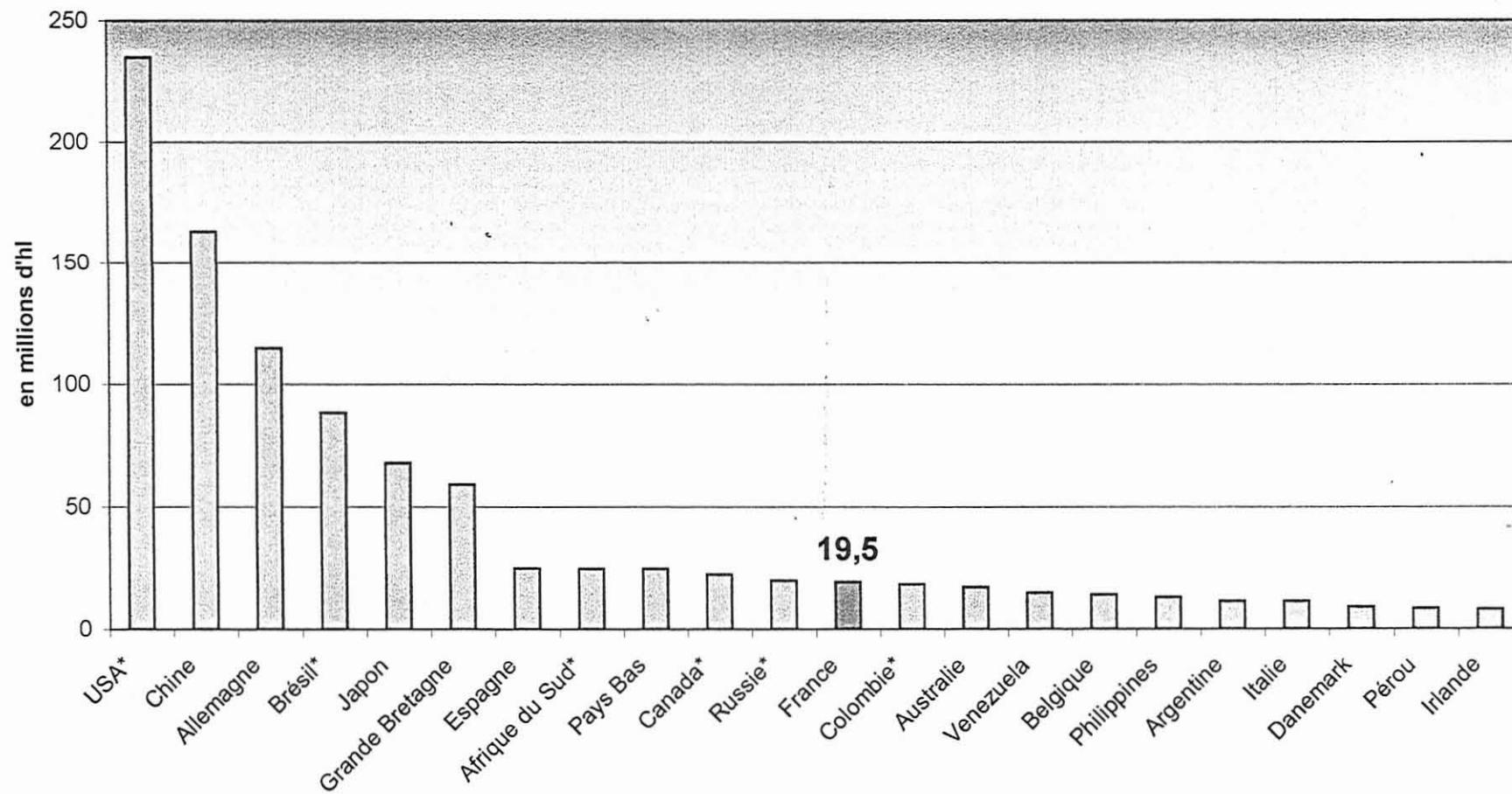


Fig.15 : Consommation française par types de bière en 1996 (28)



(en milliers d'hl)

Fig.16 : Production de bière en 1997 (28)



PRODUCTION MONDIALE : 1263 hl en 1997

(* en 1993)

Fig. 17 : Capacité de production des sites Kronenbourg
(28)

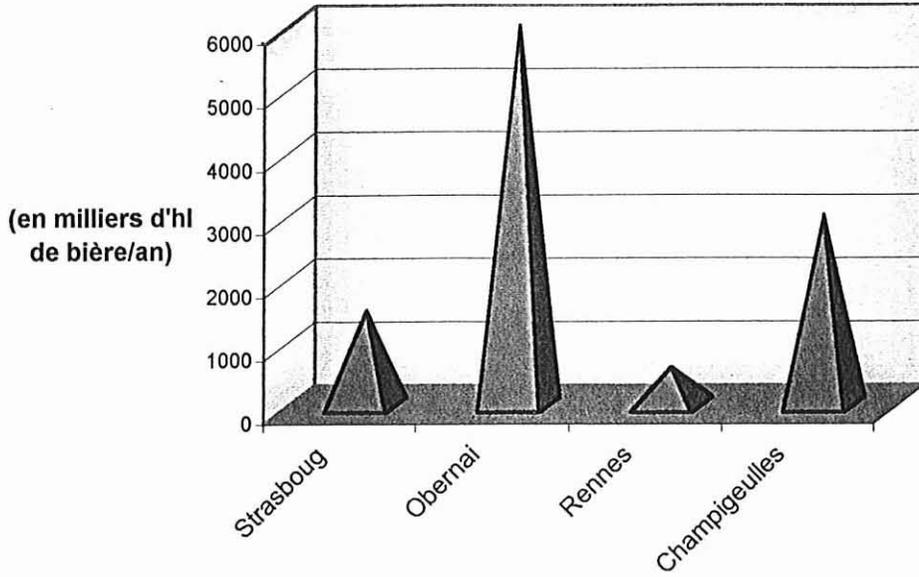
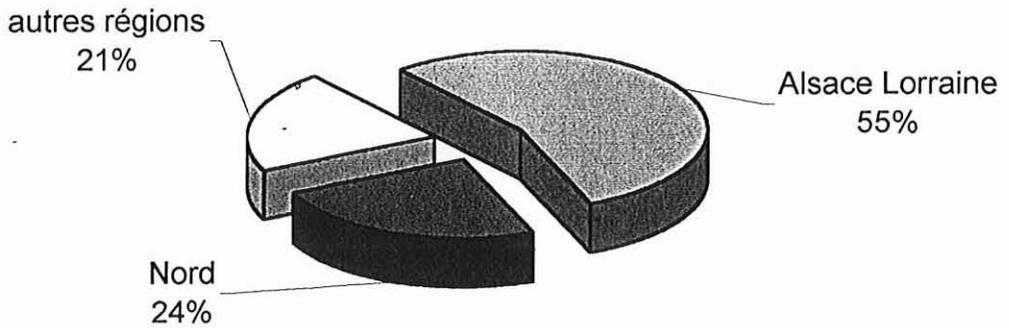
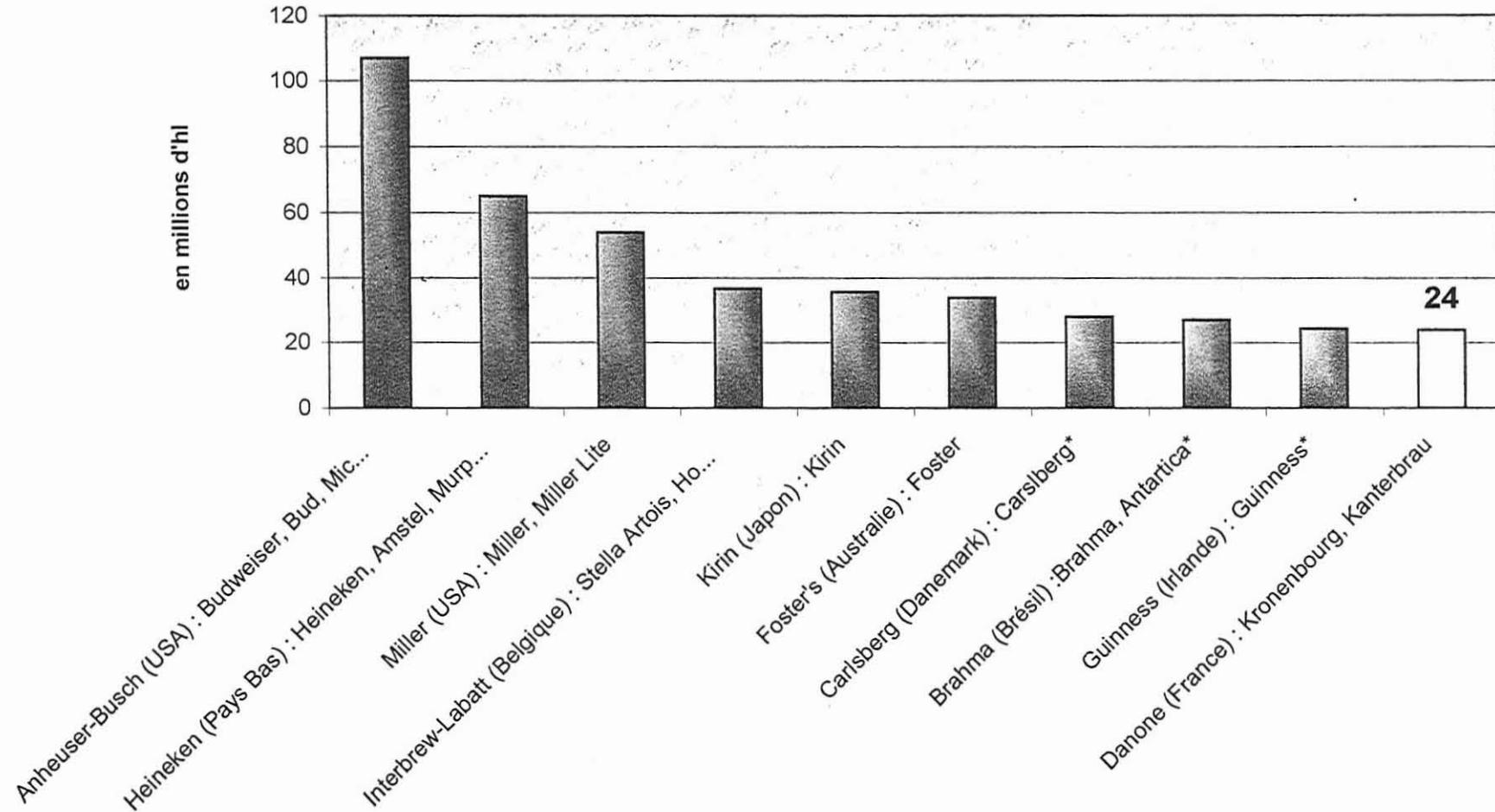


Fig.18 : Ventes de bière en France par régions
en 1996 (28)



Ventes de bière en France :
20 440 786 hl en 1996

Fig.19 : Ventes des principaux brasseurs en 1997 (28)



(* en 1993)

Remarque : les données sont antérieures au rachat du groupe Danone à la France par l'Angleterre

1.5. MATIERES PREMIERES (9, 13, 41, 61, 64)

- **Eau** de minéralisation spécifique au type de bière préparée
- **Malt** : constituant essentiel donnant la flaveur de la bière
100 kg d'orge produisent 80 kg de malt
L'orge est une céréale riche en sucre, c'est pourquoi elle a été choisie pour être fermentée.
- **Matières amylacées** : maïs, riz, sorgho, blé, orge, triticale, seigle, avoine, millet
En France, la loi autorise l'ajout de 30 % de matières amylacées par rapport au poids du malt, alors qu'en R.F.A., la préparation de la bière doit être réalisée à partir de 100% de malt.
- **Matières amères : houblon**. Anciennement utilisé exclusivement pour ses propriétés antiseptiques vis à vis des agents d'altération, on lui reconnaît aujourd'hui des propriétés aromatisantes, amérisantes et facilitantes de la clarification. Seules les fleurs femelles (« cônes ») qui sécrètent la lupuline, une poudre jaune, sont utilisées.

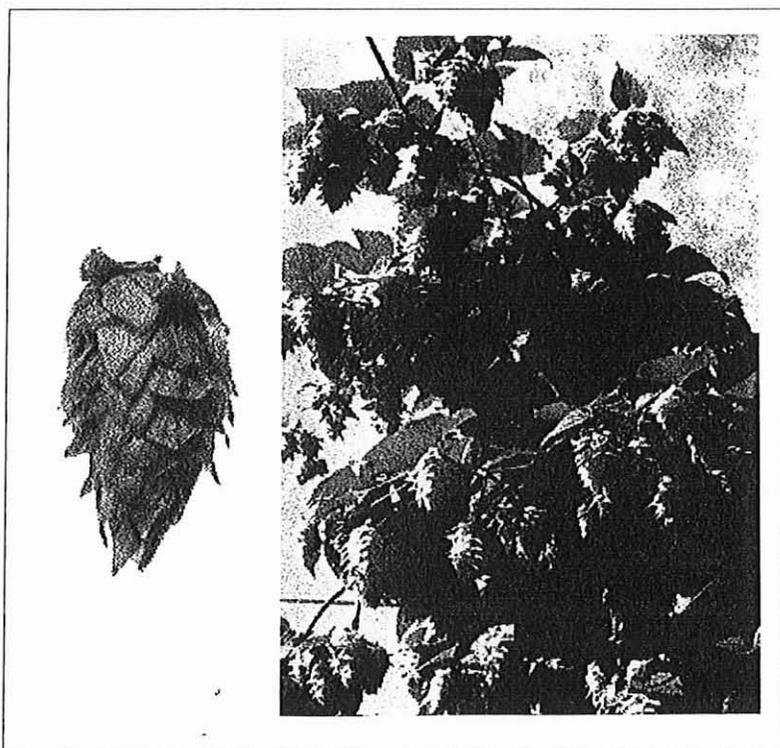


Photo.3 : Cône (fleur femelle) de houblon (68)

- **Levure** : c'est le seul ingrédient qui reste secret chez les brasseurs. Le choix de la levure est important : elle doit avoir une cinétique de fermentation rapide, floculer modérément pendant la fermentation et conduire à une saveur finale équilibrée.

Pour faire 1 litre de bière, il faut :

- ◆ 7 à 15 litres d'eau pure
- ◆ 120 –200 g d'orge
- ◆ 2 g de houblon
- ◆ 1 cl de levure (13).

1.6. PREPARATION (64) *Voir figure 20*

- **Maltage** : Après germination des grains d'orge, ceux-ci sont chauffés (touraillage). Cette orge germée et grillée s'appelle « malt vert » et donne sa couleur à la bière. C'est au cours de la germination que sont produites ou activées les enzymes responsables des réactions lors du brassage : α et β amylases, glucanases, hemicellulases, peptidases, protéases, oxydases (les protéases et les peptidases sont tout aussi importantes que les amylases car elles transforment les matières protéiques des grains d'orge en acides aminés qui servent plus tard à la nutrition des levures).

- **Brassage** : Le malt concassé en mouture est additionné d'eau : ce mélange se nomme la « maïsche » ou « brassin » (ce terme définit également le récipient où se trouve le mélange). Par filtration de la maïsche, on obtient le « moût ».

Une β *amylase* coupe les dissaccharides de l'amidon en fin de chaîne : on obtient 59 % de maltose, 20 % de maltotriose, 14 % de glucose, 6 % de saccharose, 1 % de fructose (sucres rapides). La fermentation du maltose n'est possible qu'en présence de sa perméase et d'une maltase, elle-même réprimée par le glucose. L'utilisation du maltose ne débute que lorsque la concentration en glucose est inférieure à 0,1 %. Donc le maltose est utilisé après épuisement du glucose, fructose et saccharose.

Une α *amylase* coupe à l'intérieur de la chaîne et produit des dextrines (sucres lents, non fermentescibles). Les dextrines se retrouvent intactes dans la bière et contribuent au contenu calorique. Les protéines sont dégradées en acides aminés et peptides (les acides aminés non assimilés par la levure ainsi que les petits peptides contribuent à la saveur et à la formation de mousse).

Cette étape solubilise les composés hydrolysés par les enzymes pour former le moût fermentescible par les levures.

La teneur en glucides varie de 35 à 51 g/l selon les procédés de fabrication, dont plus de 85 % sous forme de dextrines.

- **Cuisson et houblonnage** du moût : concentre le moût, stoppe l'action des enzymes, extrait la lupuline, les tanins, et les résines inhibant le développement des bactéries qui pourraient interférer avec les levures.

- **Ensemencement** du moût houblonné refroidi : 20-25 millions de cellules de levure/ml de moût pratiquement stérile car porté à ébullition (52).

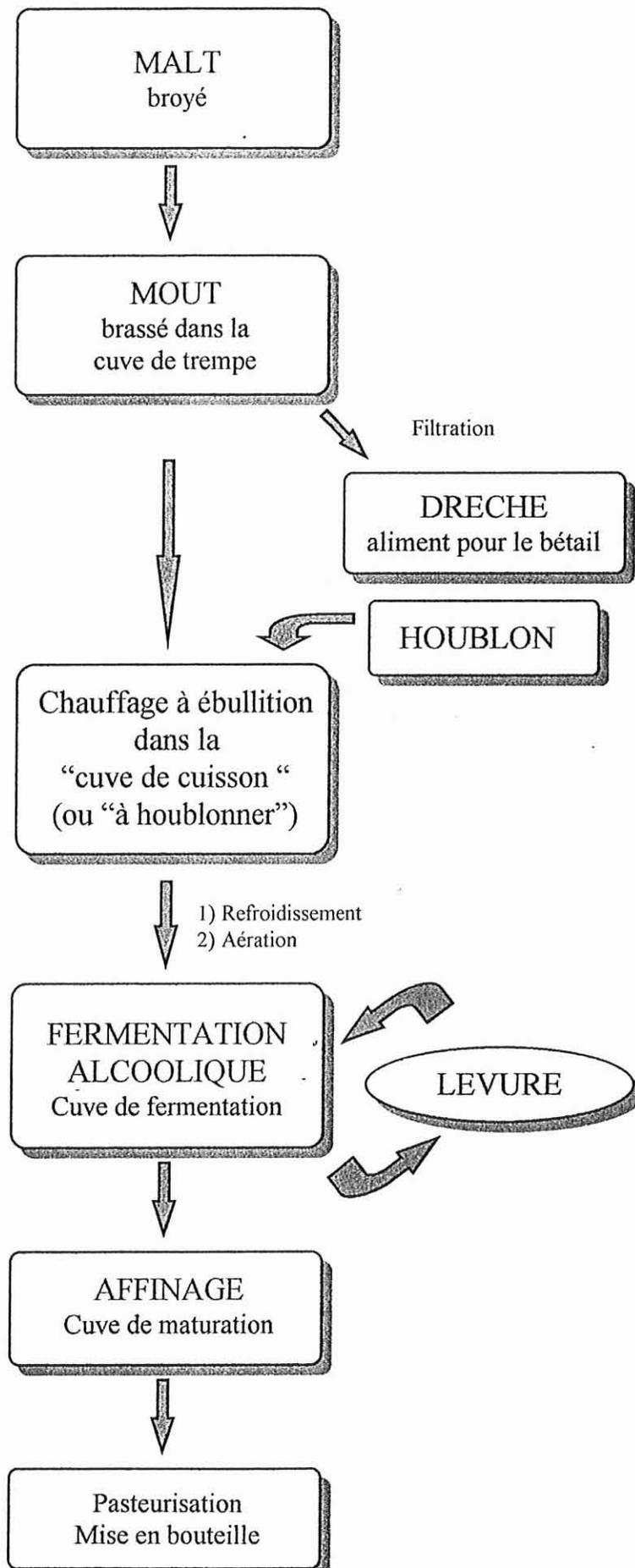
Pour initier une fermentation, les levures doivent être inoculées dans un moût à 20°C, qu'il s'agisse d'une fermentation haute, basse ou spontanée. Si le moût est à plus de 40°C, elles risquent d'être tuées ; par contre, avec une température trop basse, les levures s'endorment.

La quantité de levure doit être soigneusement ajustée : une quantité excessive accélère la fermentation mais influence souvent négativement la flaveur de la bière. Ainsi, la brasserie n'utilise que la (les) souche(s) qu'elle repique. L'usage de L.S.A. en brasserie est exclusivement réservé aux productions familiales.

En fin de fermentation, elle est récoltée, tamisée et stockée à 0°C. Elle sera réutilisée 6 à 10 fois pour de nouvelles fermentations (45).

- Phase de **croissance et fermentation primaire** (ou « principale ») : basse ou haute, d'environ 1 semaine. La population de levures se multiplie par 6 très rapidement.

Fig.20 **PROCEDE DE FABRICATION DE LA BIERE** (61, 62)



Inhibition des bactéries
Inactivation des enzymes
Aromatisation (houblon)

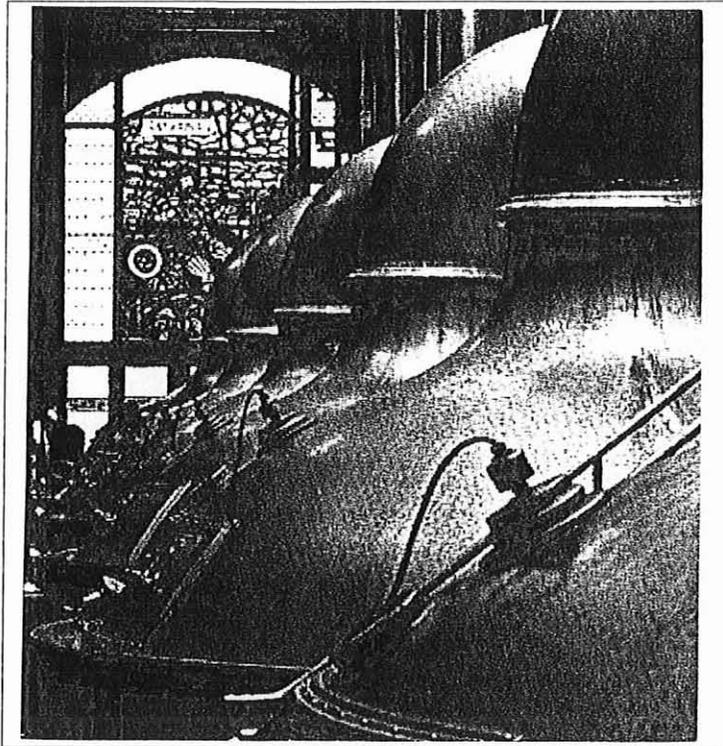


Photo.4 : Cuves de brassage (68)

- **Floculence et refroidissement**
- **Maturation** (ou « fermentation secondaire », « garde », « affinage ») : durant 2 à 8 semaines à 0°C pour stopper le processus de fermentation, elle est nécessaire car la bière possède une forte saveur de levure. La « bière verte » obtenue après filtration est placée dans des cuves de garde adaptées. C'est une fermentation lente qui affine la bière, la sature en CO₂, et précipite les matières en suspension et protéines sensibles au froid.
- **Filtration** : dépouille la bière des levures et la rend brillante .
- **Stockage sous pression à froid**
- **Pasteurisation**
- **Conditionnement**

A l'embouteillage, il faut ajouter sucre et levure afin d'obtenir une bière effervescente. alors que dans la fermentation principale, la levure travaillait uniquement pour produire de l'alcool (CO₂ s'échappe librement). En bouteille, cette même levure travaille mais cette fois principalement pour donner le CO₂ (le degré alcoolique augmente de moins de 0,5 % vol., la production d'alcool ayant lieu avant l'embouteillage, sinon, la bouteille exploserait). Bien encapsulée, la bouteille piège le CO₂ qui se dissout dans la bière et lui donne son effervescence.

Il est préférable d'ajouter du sucre de maïs (dextrose) car il n'apporte aucun faux goût alors que le sucre de canne semble donner un goût de cidre plutôt désagréable. La quantité à ajouter est fonction de la carbonation désirée . Classiquement :

Quantité de sucre à ajouter	Effervescence	Exemples
4,5 g/l	Faible	Pale ale anglaise
5 g/l	Moyenne	Lager, pils, désinvoltés
6g/l	forte	Weissen allemande, triple belge

Tab.16 : **Relation entre la quantité de sucre et l'effervescence d'une bière**
(38, 45, 9, 62, 13, 68, 41, 65, 67, 12, 48, 23, 64).

Le degré alcoolique après achèvement des fermentations est de 3,8° pour la lager mais certains procédés de fabrication permettent d'atteindre 5,5° d'alcool/volume (62).

Evolution des techniques de fabrication

- Brassage : certains pays utilisent des amylases fongiques en remplacement des amylases du malt, ce qui permet d'utiliser de plus en plus de céréales non maltées.
- Fermentation : « gigantisation » des opérations par l'emploi de cuves géantes en plein air (tanks outdoor) où se réalisent successivement fermentation principale et secondaire ; accélération de la fermentation par immobilisation de levures.

1.7. COMPORTEMENT DES LEVURES

La bière peut être préparée à partir d'une culture pure de levure, adaptée aux conditions spécifiques qu'elle va subir.

A partir d'une culture conservée en laboratoire, on obtient, après propagation, une culture de volume suffisant pour inoculer une cuve de production. Le levain récolté en fond de cuve est ensuite réutilisé pour une nouvelle fermentation, et ainsi de suite jusqu'à 10 fois.

Il existe 2 méthodes de **propagation** :

1. directe : la cuve estensemencée avec tout le levain produit
2. répétée : une partie du levain est conservée pour la propagation suivante, et ceci pendant plusieurs mois. Cette technique est plus rapide mais nécessite une asepticité très rigoureuse afin d'éviter toute contamination (9, 27).

1.7.1. Fermentation primaire ou « principale »

C'est elle qui assure la transformation de 60 % des 75 % de sucres fermentescibles présents en éthanol. L'élévation modérée de l'ensemencement n'accélère que de façon limitée la fermentation car la concentration de levure étant proportionnelle à la concentration de facteurs de croissance présents, toute augmentation de dose entraîne une réduction de ces facteurs et par suite une perte d'activité. En outre, une dose excessive peut avoir un effet néfaste du point de vue organoleptique (9).

a. Etapes

- **Phase de latence**
Durant 24h, la levure ne se multiplie pas mais est très active puisqu'elle épuise l'oxygène très rapidement, absorbe les acides aminés, peptides, sels minéraux, et fait chuter le pH. Il n'y a pas encore démarrage appréciable de la croissance ni de la fermentation. Une bonne aération du moût à l'ensemencement abrège cette phase. 7 heures seulement après la mise au levain, une fine mousse blanche et des bulles de CO₂ apparaissent.
- **Phases de croissance et fermentation**
En brasserie, le nombre de divisions cellulaires est en général très réduit (37), très certainement en raison du faible taux de substances azotées assimilables par rapport à l'inoculum. Au cours de cette phase, la fermentation est active, l'absorption d'acides aminés continue et le pH descend encore. Les divisions cellulaires sont quasi synchrones du fait de l'état nutritionnel similaire des cellules en début de fermentation. On obtient une suspension d'environ 10⁸ cellules/ml.
Le CO₂ produit est récupéré dès que sa pureté dépasse 99,9%. Il est purifié puis réutilisé à des stades ultérieurs de la fabrication ou dans d'autres industries.
- **Phase de fermentation sans croissance**
La fermentation s'arrête quand certains nutriments tels que l'azote, l'ergostérol, l'acide oléique... commencent à manquer. Les acides aminés sont presque épuisés et le pH se stabilise. Esters et alcools supérieurs apparaissent alors que les sucres s'épuisent lentement (fermentés et stockés sous forme de glycogène).
- **Phase de floculation**
Vers le 6^{ème} jour, par un phénomène encore mal connu, les levures s'agglomèrent et sédimentent. Au 10^{ème} jour, tout est terminé ; elles sont récoltées, lavées, contrôlées (pureté, viabilité), et réutilisées pour relancer une autre fermentation, revendues aux boulangers ou pour l'alimentation du bétail (9, 27, 13, 41). La bière s'est clarifiée (27).
Le caractère floculant est très important pour le brasseur car il réduit les coûts de production en évitant des centrifugations. Néanmoins, si la floculation est trop précoce, la fermentation est incomplète et la flaveur anormale. A l'opposé, si elle est absente, il subsiste un goût de levure dans la bière obtenue (41).

b. Facteurs influençant la fermentation

- **Oxygénation** du moût en début de fermentation
L'agitation favorise la fermentation car la levure est en contact plus intime avec le moût. Cependant, cette méthode n'est pas utilisée en fermentation basse car elle remet en suspension les matières amères (9, 27).
- **Température optimale**
Une température plus élevée que la température de fermentation traditionnelle (25°C) accélère la fermentation mais altère ses qualités organoleptiques (9). Il faut donc trouver un compromis car plus la température est basse, plus l'arôme est fin mais moins les capacités fermentaires sont importantes (27).

c. Fermentations haute et basse

En dehors de la fermentation spontanée qui n'est presque exclusivement pratiquée qu'à Bruxelles, il existe 2 types de fermentation : haute et basse (67).

Avant 1840, la fermentation haute était généralisée jusqu'à l'apparition de bières de fermentation basse en Tchécoslovaquie et en Allemagne (42).

En **fermentation haute**, les levures, lors de leur bourgeonnement, restent attachées entre elles en forme de grappe, piégeant ainsi les nombreuses bulles de CO₂ dégagées qui les font remonter vers la partie supérieure du fermenteur sous forme de surnageant pâteux.

Cette fermentation a lieu dans une cuve non refroidie. Le départ est rapide même si l'on utilise une quantité moindre qu'en fermentation basse. Cependant, les levures hautes sont plus sensibles aux variations de température. A la fin de la fermentation, après la floculation qui est moins importante qu'en fermentation basse, la couche de levure s'affaisse, devient compacte, se plisse.

On obtient une bière nommée « **ale** » ou « **bière brune** » de 3 à 4 % alcool vol., après fermentation 3 à 5 j à température ambiante (entre 16 et 24°C) (62). Ce type de fermentation est encore très utilisé en Grande Bretagne et en Irlande ou pour la préparation de bières artisanales, ambrées, brunes, parfois blondes, notamment avec *Saccharomyces cerevisiae* qui peut directement utiliser le glucose (38, 9, 27, 19, 23).

La bière obtenue fermente encore un peu après la mise en fûts mais elle ne se sature pas suffisamment en CO₂. Elle est difficilement claire et reste plate, c'est pourquoi on la sature artificiellement à basse température pour faire précipiter le trouble. Par ce procédé, on obtient des bières typiquement anglaises (27).

En **fermentation basse**, le dégagement gazeux est plus modéré, d'où le dépôt des levures dans le fond de la cuve en fin de fermentation. On distingue les levures « floculantes » qui précipitent rapidement en formant des agglomérats, des levures « poussiéreuses » qui restent bien séparées en suspension et qui ne se déposent que très lentement.

A la fin de la fermentation principale, la baisse de température doit être modérée et prudente pour que la garde puisse avoir lieu. A l'opposé, si on laisse trop de sucres fermentescibles, elle sera trop violente.

Les derniers jours, il faut surveiller la floculation de la levure : si elle flocule, il faut la retirer sinon la fermentation ne continue que très lentement et la garde peut ne pas avoir lieu. Quand elle flocule trop vite, il faut augmenter la température, renouveler le levain ou préparer un levain de race plus poussiéreuse. Il est de toute façon difficile d'obtenir l'atténuation et la floculation voulues. On préfère alors travailler avec 2 levures : une poussiéreuse qui fermente l'extrait non modifié par la levure floculante (27, 41).

Il en résulte, après 5 à 8 j entre 8 à 12 °C, une bière de type « **lager** » (du verbe allemand « lagern » = conserver, ou « **bière blonde** » (62, 41). *Saccharomyces uvarum* (anciennement *S. carlbogensis*) est très utilisé pour ce mode de fabrication qui est actuellement le plus répandu en Europe et Amérique du Nord (38, 9, 19).

Ce type de fermentation nécessite l'existence d'un système de refroidissement, la fermentation étant un phénomène exothermique (27).

1.7.2. Fermentation secondaire ou « garde »

Le « traversage » (transfert de la bière en fermentation de la cuve de fermentation au tank de garde) a lieu quand il ne reste que quelques traces de sucres fermentescibles et que la concentration de levures, qui a chuté en fin de fermentation, atteint quelques millions de cellules/ml en suspension. Ces dernières permettent la réalisation de modifications subtiles, notamment organoleptiques, qui constituent l'affinage. Il existe plus de 500 composés volatiles provenant du malt, du houblon et du métabolisme de la levure mais cela dépend beaucoup de la composition du moût. Si elle reste constante, une levure bien définie métabolisera les composants de manière reproductible (27, 12, 64).

Elles ne se multiplient pas de façon importante mais continuent à fermenter lentement avant de sédimenter progressivement. Durant cette phase, il y a :

- disparition de substances à saveur désagréable : acétaldéhyde, acétolactate, précurseurs du diacétyl, H₂S, mercaptans
La concentration de diacétyl doit être inférieure à 0,1 ppm dans la bière finale. Si elle dépasse 0,15 ppm, le produit a un goût de rance.
- apparition d'alcools et d'esters, sous produits du métabolisme des acides aminés, contribuant positivement à la saveur,
- précipitation des complexes tanins-protéines assurant la stabilité ultérieure de la bière au froid (9, 41).

Remarque : Il existe plusieurs procédés qui permettent ou non de réaliser les opérations de fermentation, garde et stérilisation, dans le même récipient (« tank out door »...).

La levure reste plus longtemps en suspension et l'on obtient plus facilement l'atténuation désirée. On laisse donc la fermentation aller jusqu'à la limite puis on refroidit. Le lavage par insufflation de CO₂ élimine les matières volatiles responsables du « goût de jeune ». Les avantages de ce procédé très utilisé dans les pays chauds sont la rapidité et la facilité.

En outre, par des procédés de fermentation continue, on accélère la fermentation pour réduire le nombre de cuves nécessaires en soutirant partiellement le liquide fermenté et en le remplaçant par du moût frais. En faisant varier la température, l'agitation et la concentration de levure, on peut faire varier la production de bière dans un rapport de 1 à 6 (27).

1.8. CARACTERISTIQUES DES SOUCHES DE BRASSERIE

La fermentation d'un moût de brasserie fait intervenir un grand nombre de levures dont les critères de sélection peuvent parfois être améliorés par génie génétique.

- **Fermentation rapide** mais sans excès de croissance
Quoi qu'il en soit, le taux de croissance est rarement exponentiel en brasserie.
On recherche plutôt une intensité fermentaire (production de CO₂/g de levure) élevée.
La mise au point de souches capables d'utiliser le maltose en présence de glucose permettrait d'augmenter la vitesse de fermentation.
- Capacité à **fermenter les dextrines** à plus de 3 unités glucose (maltotétraose, maltopentose). Cette propriété est utile pour la fabrication de bières légères.
On a ainsi cloné le gène de l'amyloglucosidase de *S. diastaticus*, capable d'hydrolyser totalement les dextrines (libérées dans le moût par action du malt). Le taux de calories est abaissé à 100 cal/350 ml contre 160.
- **Activité glucanolytique** : les levures hydrolysent les glucanes de la paroi du grain d'orge qui peuvent gêner la filtration. Le grain d'orge contient cette enzyme mais étant thermolabile, elle est détruite lors du séchage du malt.
- **Résistance à l'éthanol et à une pression osmotique élevée** pour la fermentation de moûts à haute densité
- **Profils aromatiques** équilibrés et reproductibles
Cette évaluation est difficile puisque les substances aromatiques préexistent dans le houblon et puisque la production de composés aromatiques dépend également de la composition du milieu.
On a tenté de cloner le gène inhibant la production de diacétyle sur *S. cerevisiae*.
De même, on a cherché à accroître l'expression de stérols.
- **Caractère floculent**
Il consiste en une agglutination réversible des levures en flocons : cette dernière n'établit donc plus un bon contact avec le moût, d'où l'arrêt de la fermentation.
Une souche de brasserie ne doit être ni trop floculante, ni trop poussiéreuse.
Une cellule âgée est presque toujours plus floculante qu'une cellule jeune.
- Bonne **stabilité génétique** dans le temps (52, 9, 41, 65, 64, 23, 27, 21, 62, 27).

La souche est la clé de la réussite : connaissant ses besoins, il est possible d'orienter efficacement son choix et de la conserver en bon état. Par exemple, si on recherche une bière à l'arôme fin, on utilisera une levure floculante.

En outre, il faut la rajeunir régulièrement dans le moût car une dégénérescence sans cause expliquée peut avoir lieu si le moût comporte trop de cellules âgées, asphyxiées ou mortes.

Enfin, elle doit être réutilisée au plus vite après récolte ou stockée à 0°C (les levures hautes comme les levures basses), puis lavée avant réutilisation pour la débarrasser des matières amères. Sinon, elle dégénère très vite (27).

1.9. COMPOSITION ET PROPRIETES DE LA BIERE (13, 19, 64).

Le pain et la bière (rappelons l'utilisation des levures de bière récupérées par les Gaulois dans la mousse de bière pour lever le pain) ont une composition peu éloignée, à l'exception près de la présence d'alcool dans la bière. Le pain est toutefois plus riche en protéines. L'arôme de la bière est essentiellement apportée par le houblon (13).

C'est une boisson hydratante et diurétique.

La bière sans alcool favorise la récupération en entraînant une diurèse plus rapide et plus importante après un effort sportif. De plus, elle est aussi source de vitamines et magnésium pour le sportif.

Glucides

Ils représentent 90 % des composés solides d'un moût de fermentation basse et sont répartis comme suit : 75 % de sucres fermentescibles (maltose, maltotriose, glucose, fructose, saccharose), 25 % de sucres non fermentescibles (dextrines essentiellement : 27 g/l). Il n'existe pratiquement pas de glucose ni de fructose. Le saccharose est présent seulement dans quelques bières brunes. Le produit fini contient 35 à 51 g/l de glucides.

Protéines

Elles proviennent de l'orge malté, des substances amylacées additionnées (85 %) et des levures (15 %).

Vitamines

Dès l'Egypte ancienne, la bière était utilisée pour traiter les anémies par sa richesse en vitamine B (B₁, B₂, B₅, B₆, B₉, B₁₂) (12).

Durant des siècles, les Vikings ont consommé de la bière à bord de leurs vaisseaux pour lutter contre certaines avitaminoses telles que la pellagre et le scorbut.

1 l de bière apporte : (en % des A.J.R)	Vit. PP 100	Vit. B₂ et B₆ 80	Vit. B₉ 33	Vit. B₁ et B₅ 10
--	-----------------------	--	---------------------------------	--

Tab.17 : Apports en vitamines assurés par la bière

Les vitamines B sont indispensables au fonctionnement du système neuromusculaire. Les vitamines B₂, B₃ et B₅ interviennent dans le bon état de la peau et des muqueuses ; les vitamines B₆, B₉, B₁₂ dans la formation des globules rouges. Les vitamines B assurent également une certaine protection cardiovasculaire, à côté de l'effet protecteur de l'éthanol sur les artères dans la cadre d'une consommation régulière et modérée (20 à 40 g d'alcool/j), sachant qu'une bière à 4,7° en contient 3,8 g/100ml, un vin à 11°, 8,8 g/100ml et un whisky, 36 g/100ml.

C'est la seule boisson qui apporte une telle quantité de vitamines B. Elles sont plus facilement absorbées grâce à la présence de magnésium qui se révèle par ailleurs très utile pendant les périodes de stress ou de régime alimentaire, en dehors du fait qu'elle favorise l'action de la vitamine PP.

Minéraux

La bière apporte des quantités négligeables de magnésium (70 à 135 mg/l), potassium (300 à 700 mg/l), phosphore (18 à 130 mg/l) et calcium (50 mg/l).

Valeur énergétique

La valeur énergétique de la bière est répartie entre l'alcool (70 %) et les glucides (19).

C'est une boisson légère, peu calorique (45 kcal/100ml) et peu alcoolisée (4,7° en moyenne).

	Calories (kcal/100ml)
Gin	265
Whisky	252
Porto	160
Vin	70-100
Lait entier	65
Sodas	49
Jus de fruits pressés	40-50
Bière	35-45

Tab.18 : Comparaison des valeurs caloriques de différentes boissons (13, 12)

Contrairement aux idées reçues, la bière, consommée avec modération, ne fait pas grossir et ne favorise pas non plus la prise de poids. La bière sans alcool, qui contient encore 2 fois moins de calories, est une alliée des régimes. Si l'on accuse parfois les Germaniques d'avoir un poids excessif à cause de la bière, n'est-ce-pas plutôt en raison de leur mode de vie et de leur alimentation riche en graisses qui y est associée ? En effet, les Japonais consomment tout autant de bière et ont un poids moindre mais une alimentation par ailleurs très différente.

(Résultats du P^r Debry, directeur du Centre de Nutrition Humaine de NANCY – 1994) (13, 12).

∴

2. LE VIN

2.1. HISTORIQUE

Le vin, tout comme la bière, est né quand l'homme commença à domestiquer les récoltes et qu'il les stocka. Dans le cas du raisin, en présence d'une aération bénéfique, les fermentations spontanées devaient permettre d'obtenir un produit, certes stimulant et revigorant, mais pas toujours très savoureux.

On retrouve des traces de l'existence du vin en Mésopotamie, en Arménie, en Egypte et en Grèce.

Longtemps inexplicée, la fermentation alcoolique du jus de raisin n'a été maîtrisée que très tard. C'est ainsi qu'au Moyen âge, les vins étaient additionnés de miel, d'épices ou piments sans doute pour atténuer certains défauts de fermentation (9).

Les travaux de Pasteur et de l'Institut Carlsberg ont permis à la fin du XIX^{ème} siècle, de mettre au point des techniques d'isolement de cultures pures de levure, pour pallier aux résultats aléatoires des fermentations dites spontanées, c'est à dire sans addition de levure sélectionnée. Ces souches commercialisées portaient le nom de « cépage » (Merlot, Pinot, Fendant, Cabernet-Sauvignon...), de régions (Bordeaux, Alsace, Beaujolais...), de communes (Barsac, Beaune, Asti...) voire même de domaines (Clos de Vougeot...) viticoles.

Ce n'est que vers 1955-1960 que l'on produit des levures de vinification en aérobiose. Dans les années 1960, cette production industrielle a été prise en charge par les producteurs de levure de boulangerie. Les produits commercialisés avaient l'aspect d'un gâteau comprimé, humide, contenant 70 % d'eau qui se conservait mal. D'où la mise sur le marché, dès 1964, de préparation de **L.S.A.** de vinification après mise au point des procédés de séchage (21, 73).

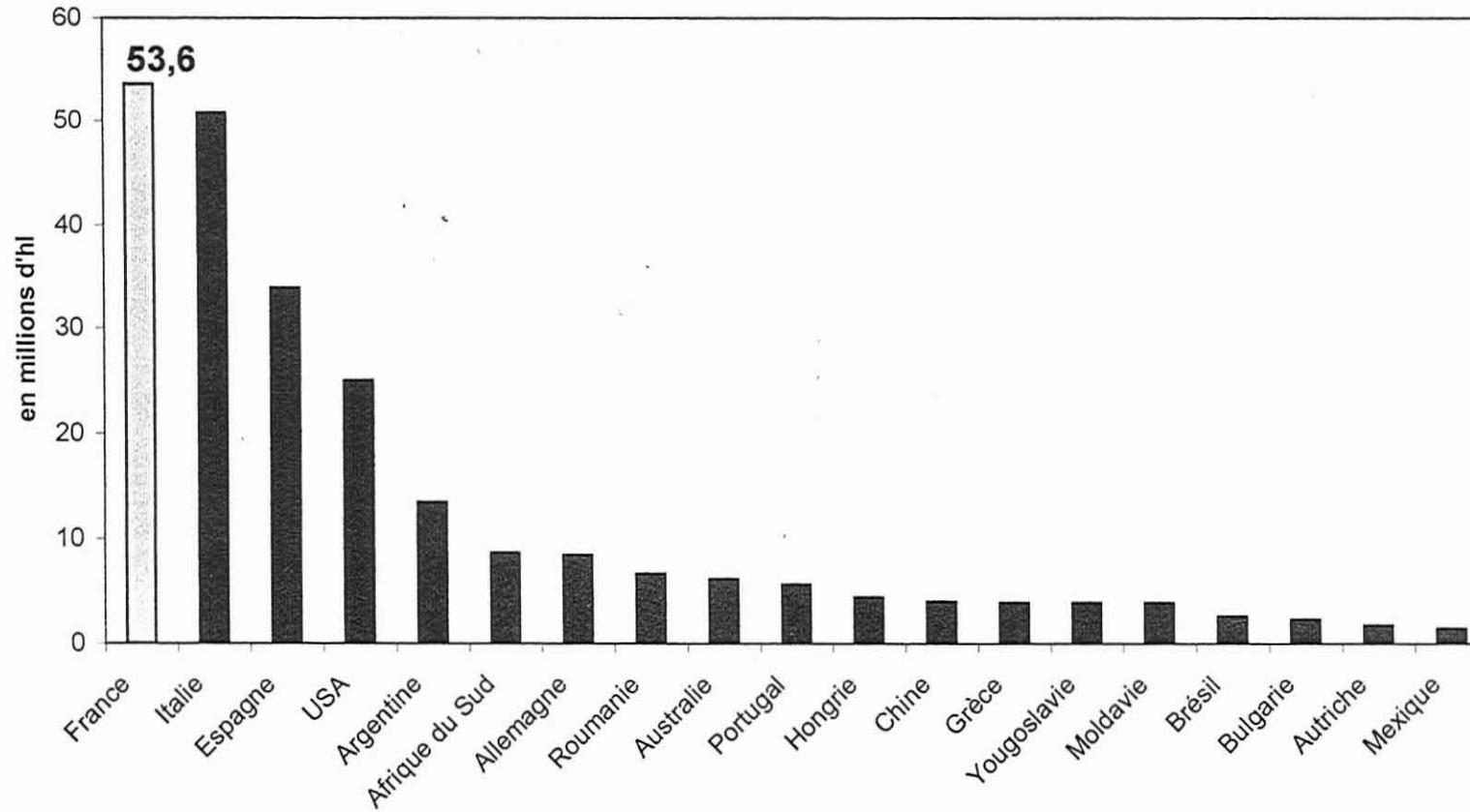
2.2. PRODUCTION *Voir figures 21, 22*

La production mondiale de vin (264,4 millions d'hectolitres en 1997) représente 1/3 de la production européenne de bière. Plus de 75 % de la production mondiale est réalisée en Europe, les 3 premiers pays producteurs étant l'Italie, la France et l'Espagne, qui produisent à eux seuls plus de 140 millions d'hl. En France, le Languedoc, la Vallée du Rhône et le Bordelais sont les régions les plus productives.

2.3. CONSOMMATION

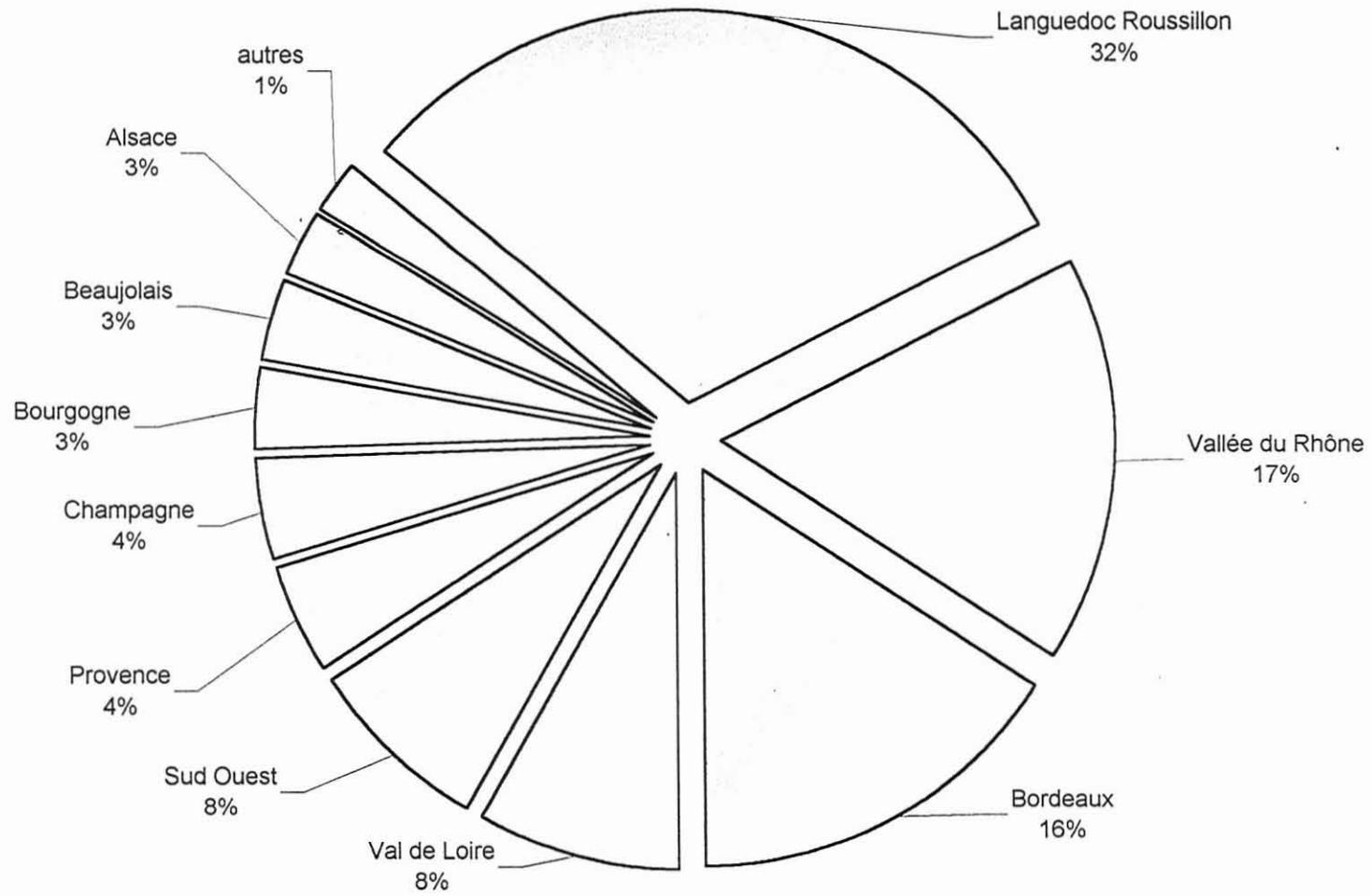
La consommation est très variable d'un pays à l'autre (bien que la France soit en tête avec l'Espagne, le Portugal et l'Italie), ainsi qu'à l'intérieur d'un même pays, les habitudes de consommation évoluant. Ainsi, la consommation par habitant a chuté de 50 % en un siècle, et avoisine les 71 l/hab en 1990. Cependant, elle s'oriente vers les vins de qualité (41, 42, 23, 28).

Fig.21 : Production de vin en 1997 (28)



Production mondiale : 264,4 millions d'hl

Fig. 22 : Production de vin par régions en 1997 (28)



2.4. COMPOSITION ET CARACTERISTIQUES DU MOÛT (64)

Tout moût de raisin, issu du pressurage des baies, est un excellent milieu de culture pour les levures (9).

Sucres en C ₆	170-200 g/l
Azote assimilable	50-400 mg/l
Facteurs de croissance	Peu
pH de début	3-3,4
Ethanol	Absent au départ

Tab.19 : Composition du moût de raisin (41)

Sucres

La vitesse de fermentation augmente avec la teneur en sucre : les levures oenologiques ne sont pas gênées par 100-200 g de sucre. Néanmoins, un taux supérieur a un effet inhibiteur qui s'ajoute à celui de l'alcool et qui contribue à arrêter prématurément la fermentation.

Cette teneur en sucre peut être augmentée jusqu'à 200 g/l par chaptalisation.

Glucose et fructose (en quantités égales) sont les principaux mais l'on peut également trouver des pentoses (arabinose, xylose, rhamnose).

La multiplication des levures s'arrête alors qu'il reste encore 50 % ou plus des sucres. Elles cède le pas à la fermentation durant laquelle les cellules gardent une viabilité de 95 %.

Azote ammoniacal

Le moût de raisin en est généralement bien pourvu mais un apport en NH₄⁺ peut se révéler nécessaire certaines années de grande maturité ou lorsqu'il s'agit de moûts comportant *Botrytis cinerea* qui le consomme. En apportant des sels d'ammonium, on augmente presque toujours la population levurienne et la vitesse de fermentation. Il est conseillé de réaliser la supplémentation avant le début de la fermentation mais elle peut également servir à relancer une fermentation paresseuse.

La richesse en azote varie selon la composition du sol de la vigne et selon la maturité des grains. L'azote total n'est composé qu'à 20 % d'azote assimilable comprenant l'azote ammoniacal et les acides aminés nécessaires à la croissance des levures en fermentation alcoolique (acides aminés quantitativement les plus importants : Glu, Pro, Ala, Arg). L'azote assimilable diminue progressivement lors de la maturation.

Vitamines

Ce sont essentiellement la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine, l'acide pantothénique, l'acide nicotinique, la biotine et l'inositol.

Minéraux

La composition du moût dépend entièrement de la composition du sol dont est issu le raisin.

Composés phénoliques

- ◆ Raisins noirs : anthocyanes,
- ◆ Raisins blancs : flavones,
- ◆ Tanins à doses élevées (5 g/l) : confèrent plus ou moins d'astringence.

Température

Elle ne doit pas excéder 32-34°C, valeur au delà de laquelle certaines souches meurent. Ainsi, pour des vins rouges, on ne dépassera pas 28-30°C, 18°C pour des vins blancs.

Le **pH** est compris entre 3,0 et 3,5 (9, 49, 41).

Certains traitements peuvent affaiblir la richesse nutritive du jus de raisin :

- ◆ La clarification plus poussée des moûts dans l'élaboration des vins blancs réduit la flore microbienne et la quantité de substances nutritives.
- ◆ Les résidus de pesticides peuvent inhiber la fermentation alcoolique, en particulier de vinification en rouge qui nécessite un long contact du jus avec les pellicules.
- ◆ La surmaturation du raisin : moins d'azote assimilable, trop de sucre en début de fermentation, inhibition par l'alcool en fin de fermentation (9).

2.5.FABRICATION DU VIN *Voir figure 23*

Quand les raisins arrivent à maturité, ils ont déjà accumulé du sucre sous forme de glucose et de fructose ainsi que des acides. Cette maturité est évaluée selon la composition des grains, mais il faut également considérer le cépage, la région, le climat... (62).

Notons que la fermentation malolactique, qui consiste en une réduction de l'acidité du moût par transformation de l'acide malique en acide lactique (moins acide) et CO₂, est essentiellement bactérienne (62, 61, 41).

Malgré les progrès technologiques et la maîtrise de plus en plus grande de la fermentation par la sélection de souches et le contrôle des paramètres, la composition du vin est trop complexe et trop mal connue pour envisager la fermentation en continu (9).

Les différents types de vinification

• en rouge

En « vinification rouge », le raisin entier est récupéré alors qu'en « vinification blanche », les éléments solides (pépins, rafle) sont retenus par pressurage (62).

• en blanc

Fermentation du seul jus de raisin, c'est-à-dire sans macération des parties solides de la grappe. On ne doit pas s'étonner de fabriquer du vin blanc à partir de raisins noirs car la plupart des pigments sont contenus dans la pellicule qui enveloppe la pulpe incolore. Quant aux vins rosés, leur macération est très courte (62).

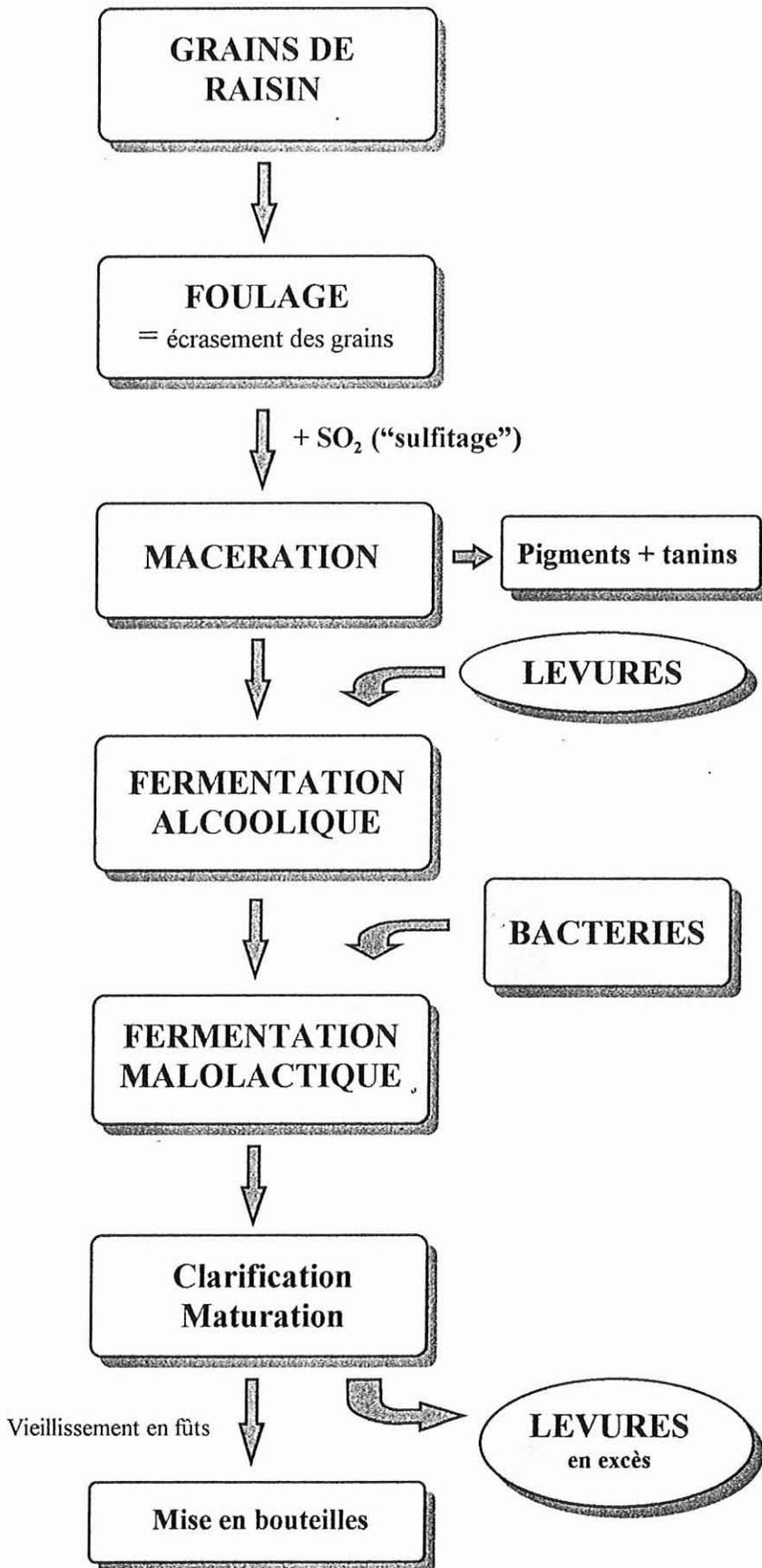
• en rosé

Intermédiaire entre le vin obtenu sans macération et le vin de macération. Ils sont obtenus soit par vinification en blanc de raisins rouges, soit par macération partielle, dite « par saignée ». Ces derniers ont le nom de « clarets, vins de café, vins d'une nuit ».

Fig. 23

PROCEDE DE FABRICATION DU VIN

(61, 62, 56)



Anhydride sulfureux (SO₂) : antiseptique oxydant moins actif sur les levures que sur les autres agents microbiens

Une stérilisation préalable du moût permet d'éliminer les souches indésirables.

Glucose et fructose sont transformés en éthanol

L'acide malique est transformé en acide lactique et CO₂.

Elimination du CO₂, des levures...

Développement du **goût final** du vin et poursuite des transformations anaérobies.

• vins moelleux et liquoreux

Ils sont naturellement doux parce que leur fermentation est incomplète : elle s'arrête d'elle-même ou artificiellement pour conserver une certaine proportion des sucres du raisin. On classe ces vins arbitrairement en :

- secs : < 4 g de sucre/litre
- demi secs : 4 à 12 g/l
- moelleux : à 45 g/l
- liquoreux, doux : > 45 g/l

Ce sont des appellations comme le Sauterne, certains vins de la Loire (Côteaux du Layon), le Jurançon, la majorité des vins allemands, les vins les plus courants de Californie. Le Champagne lui-même n'est pas tout à fait sec : le brut contient 8 à 12 g/l de sucres. L'élaboration des vins moelleux ou liquoreux impose l'arrêt de la fermentation (ou mutage) par l'ajout massif de SO₂, d'alcool, ou par instauration d'une température inadéquate au travail levurien, qui bloque instantanément la transformation du sucre mais ne tue que partiellement les levures.

• vins doux naturels

Ces vins sont élaborés dans la région du Roussillon. Ils proviennent exclusivement de la fermentation du jus de raisins frais, stoppée par mutage à l'alcool, ce qui permet de les rendre doux (70-125 g de sucre/l). Ils ont un degré alcoolique de 15 – 16° (49, 61, 56, 23, 48).

2.6. PROCESSUS FERMENTAIRE

2.6.1. Fermentation spontanée (73, 64)

Jusque vers 1870, la fermentation alcoolique du jus de raisin s'est développée spontanément à partir de la flore sauvage portée sur la baie de raisin dans les régions viticoles. Contrairement au moût de bière, un moût de raisin contient donc un grand nombre de levures provenant du raisin lui-même (en surface car le jus de raisin d'une baie saine est stérile), des matériels de récolte et de la cave. Elles constituent la flore la plus importante car ce sont elles qui rencontrent les meilleures conditions de développement. En effet, elles résistent aux tanins et peuvent se développer même en anaérobiose presque complète. Au cours de la fermentation, il faut aérer le moût et parfois refroidir la cuve pour ne pas nuire à leur multiplication.

Quelques espèces les plus couramment rencontrées : *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidus*, *S.oviformis*, *S.uvarum*, *S.elegans*, *S.bayanus* et d'autres espèces, *Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis stellata*, *Schizosaccharomyces* sp., *Candida* sp.,... (38, 9).

Une fois achevée, les levures cèdent la place aux bactéries qui assurent une fermentation malolactique. Cette dernière stabilise le vin et lui a généralement permis de gagner certaines qualités organoleptiques (38).

2.6.2. Fermentation contrôlée et levurage (23, 73, 64)

Selon les conditions météorologiques, la région viticole, le type de vin recherché, le type de cuve employée, la température des chais... la fermentation se développait avec une flore différente d'une année sur l'autre. On obtenait donc une très grande disparité dans la qualité des vins.

Les accidents étaient fréquents : arrêts de fermentation ou fins de fermentation difficiles, souvent dues à des températures de cuve de 30-35°C inhibant l'activité cellulaire. Une autre cause peut être une forte concentration en sucre entraînant un niveau élevé du degré alcoolique en fin de fermentation, d'où les phénomènes d'inhibition (qui est parfois due à la levure elle-même en produisant des substances inhibitrices de la fermentation par métabolisme secondaire).

Les résidus de pesticides, produits de traitement de la vigne ou le débouillage (indispensable pour obtenir des vins plus fins) éliminent une partie de la flore (45).

Remarque : le débouillage consiste à séparer le jus des particules en suspension car *Saccharomyces cerevisiae* produit plus d'esters volatils en milieu limpide. Le vin est plus aromatique et ne possède pas de goût herbacé (23).

On y remédia d'abord par l'aération du vin, le réensemencement avec des levures fraîches, l'ajout de minéraux (phosphate d'ammonium) ou de vitamines (thiamine). Mais ceci avait plutôt une influence néfaste sur les qualités organoleptiques du vin (45, 41).

La fermentation alcoolique a donc été orientée par un levurage à l'aide de souches sélectionnées (38).

Il est maintenant communément admis que les levures qui colonisent naturellement une vigne sont spécifiques d'un terroir, d'un environnement, d'un raisin et d'un moût et sont au moins partiellement responsables de la typicité des vins. Par conséquent, le levurage, s'il est pratiqué, ne doit se faire qu'avec des **souches originaires** du terroir correspondant pour les grands vins.

Le levurage connaît un essor important depuis une quinzaine d'années (45, 52). Ce procédé est maintenant de pratique courante, notamment avec *Saccharomyces cerevisiae*.

• Définition

Le levurage consiste à ajouter à la cuve des levures bien choisies et en pleine activité afin qu'elles se multiplient dans le moût et provoquent la fermentation alcoolique.

• Avantages

- départ de fermentation plus rapide
- fermentation régulière et complète évitant la piqûre lactique ou la refermentation du vin
- réduction du SO₂ combiné et de l'acétaldéhyde
- réduction des taux d'acidité volatile
- action bénéfique sur la base et les arômes des vins apportés par certaines souches
- moindre formation de produits secondaires indésirables (anhydride sulfureux, hydrogène sulfuré)

• Choix des levures

Il existe 2 types de levurage

1. Levurage de base

On choisira des levures capables de fermenter rapidement une importante quantité de sucre, formant peu de produits secondaires et ne donnant au vin aucun caractère particulier. Plusieurs souches de *Saccharomyces cerevisiae* répondent à ces critères. De nouvelles souches forment de faibles quantités de SO₂ en l'absence de mousse.

2. Levurage spécifique

- ◆ « levures aromatiques » ou « **levures sèches actives** » (L.S.A.). Ce sont les plus utilisées mais la réactivation doit être rigoureusement respectée et doit obligatoirement comporter une acclimatation des levures au milieu alcoolique pendant plus de 24 heures (9).
- ◆ *Saccharomyces bayanus* : présente une haute résistance à l'alcool. C'est une levure finisseuse car elle favorise les fins de fermentation.
- ◆ *Schizosaccharomyces pombe* : en attaquant l'acide malique, elle provoque une désacidification sensible des vins.
- ◆ Crèmes de levure : taux de cellules variable (10^6 à 10^7 /g)
- ◆ Suspensions de levures acclimatées : 10^7 à 5.10^8 /ml
- ◆ Levures fixées : 10^9 /g
- ◆ Levures lyophilisées : 10^6 - 10^7 /g

• Quand levurer ?

Les levures apportées nécessitent un certain temps d'adaptation à leur nouvel environnement avant de reprendre leur activité. Ce n'est qu'après ce délai qu'elles pourront prétendre concurrencer les levures indigènes du moût.

En conséquence, il faut les apporter tôt, même les *Saccharomyces bayanus* qui sont les levures finisseuses et qui auront alors atteint leur pleine activité en fin de fermentation.

En cas d'arrêt de fermentation, le levurage à doses massives (4 fois la normale) de levures (*S.bayanus*) est une alternative (49).

En œnologie, étant donné que l'on travaille traditionnellement sur un milieu non stérile, même si l'on ensemence avec une souche sélectionnée, il n'est pas certain qu'elle s'imposera face à la population microbienne déjà présente. Une solution peut être l'emploi de levures tueuses ou « killer » (cf. plus loin) (41).

• Sélection des souches de levure utilisées pour le levurage (64)

Les souches sélectionnées appartiennent pour la plupart à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, caractérisée par sa capacité à fermenter une quantité importante de sucre (170-240 g/l) avec des fins de fermentation dans des milieux riches en alcool (10-14°).

Favorables	Défavorables	Autres
Bon rendement en éthanol	Production d'H ₂ S	Tolérance au SO ₂
Tolérance à l'éthanol	Formation d'acidité volatile	Caractère killer
Production d'esters	Production de SO ₂	Dégradation de l'acide malique
Production de glycérol	Formation d'écumes	
Adaptation à des températures extrêmes (basses ou élevées)	Production exagérée d'alcools supérieurs	
Exigences faibles en éléments nutritionnels	Production de composés combinant l'H ₂ S	
Résistance au CO ₂		

Tab.20 : Critères de sélection des levures œnologiques (52, 45, 21)

Cette sélection se fait en plusieurs étapes :

- Pour une température donnée, la vitesse de fermentation sera un facteur important car une vitesse trop lente risquera de favoriser le développement d'autres micro-organismes ou d'entraîner des fins de fermentation difficiles, liées à un niveau d'alcool élevé.
- Dans la mesure où tout le traitement au SO₂ reste indispensable pour inhiber la flore indigène (antiseptique couramment employé) et limiter les risques d'oxydation, les souches devront être peu inhibées par le SO₂ sachant que la tendance actuelle consiste à réduire son apport.

Sulfitage	100 à 150 mg/l	> 250 mg/l
Espèces sensibles	<i>Saccharomyces rosei</i> , <i>Kloeckera</i> , <i>Hanseniaspora</i>	
Espèces résistantes	<i>S. ellipsoideus</i> , <i>Torulopsis stellata</i>	<i>S. bairii</i> , <i>S. ludwigii</i>

Tab.21 : **Résistance au sulfitage** (49)

- Le facteur killer est important dans la mesure où l'on plante une souche sélectionnée dans un milieu contenant plusieurs centaines de levures sauvages par millilitre de jus (45).

2.6.3. Les 2 types de fermentation du vin

Le jus de raisin fait l'objet de plusieurs fermentations :

♦ Fermentation alcoolique (23)

Etape essentielle de toute vinification, elle permet de transformer les sucres en alcool, CO₂ et différents composés organoleptiques.

Elle peut durer de quelques jours à plusieurs mois selon les conditions du milieu, la région, le type de vin recherché, la température et la concentration en sucre.

L'ensemencement en culture pure est réalisé par addition de 1 à 5 millions de cellules de levure/ml. L'aération naturelle du moût lors de l'écoulement du jus dans la cave permet l'obtention d'une population levurienne de 100 à 150 000 000 cellules/ml en 48 h à 20°C.

La fermentation alcoolique est un processus complexe qui doit être surveillé constamment par la teneur en sucres fermentescibles et la température (qui doit rester inférieure à 30°C sinon la fermentation s'arrête ; les vins de grande qualité sont vinifiés entre 21 et 24°C).

Au terme de cette première fermentation, le vin a acquis sa teneur finale en alcool. Le titre en alcool qui dépend notamment de la richesse initiale en sucre du raisin, se situe généralement entre 9 et 14 %. Au delà, la croissance des levures est inhibée. Par conséquent, les vins dont le titre est supérieur ont nécessairement été enrichis en alcool ou ont été chaptalisés, c'est à dire que l'on a ajouté du saccharose dans le jus de raisin en fermentation, sachant que le rendement alcoolique d'une levure dans des conditions habituelles de vinification se situe aux environs de 1° d'alcool pour 17 g de sucre fermenté. (45, 62).

90 % des sucres seront utilisés d'abord par oxydation, ensuite par fermentation, avec production de petites quantités de glycérol, 2-3 butane diol, acétone, éthanol et divers composés comme les acides acétique, lactique et pyruvique.

Les 10 % restants sont utilisés dans la synthèse de divers produits secondaires dont les composés organoleptiques : alcools supérieurs, esters, acides aminés, peptides, polyosides, esters lourds... (9).

La plupart des difficultés sont dues à des fermentations lentes ou des fins de fermentation difficiles liées à de fortes concentrations initiales de sucre et surtout à de fortes concentrations finales en éthanol.

En outre, la nécessité de régulation de la température des cuves de fermentation n'est plus à démontrer puisque la fermentation alcoolique, exothermique, se bloque à 35°C (9).

En cas d'arrêt de la fermentation, on sépare le vin du reste du marc qui peut avoir été contaminé par des bactéries lactiques ; une aération et un léger sulfitage suffisent généralement à faire repartir la fermentation. Sinon, un réensemencement avec des L.S.A s'impose (23).

◆ Fermentation malolactique

Elle n'est pas recherchée systématiquement et est en très grande majorité assurée par des bactéries lactiques anaérobies. Elle a pour fonction de transformer l'acide malique (diacide) en acide lactique (monoacide) et CO₂ ce qui permet d'obtenir des vins plus souples, moins acides, et même d'éliminer l'acide malique biologiquement instable qui confère au vin une « verneur » indésirable. Elle est très recherchée sur les vins rouges de Bordeaux et Bourgogne et sur les Champagnes mais non désirée pour les vins blancs de la Loire.

Différentes espèces de levures sont capables de dégrader l'acide malique : c'est le cas de *Schizosaccharomyces*. Malheureusement, son association avec *Saccharomyces cerevisiae* ne permet pas l'obtention de vins de qualités organoleptiques satisfaisantes (9, 56).

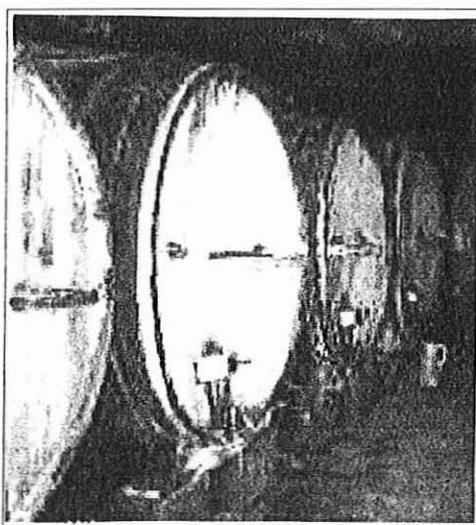


Photo.5 : Cuves de vinification (76)

2.7. LA MICROFLORE DE LA FERMENTATION VINAIRE (73, 64)

Numération

Le nombre de colonies de levures sur les grappes recueillies sur le cep est faible et irrégulier. Des grappes saines coupées et écrasées aseptiquement n'en contiennent pas plus. En revanche, les levures sont plus nombreuses sur les grappes manipulées par le vendangeur mais c'est après le foulage et les manipulations que les levures se rencontrent en abondance : les appareils sont toujours recouverts de jus de raisins et largement exposés à l'air d'où le développement très rapide des levures (49).

Qualitativement

Contrairement à ce qui est courant dans la plupart des industries de fermentation, la stérilisation par la chaleur du jus de raisin de façon à détruire la flore indigène (en particulier les levures sauvages) est impossible car elle modifierait les arômes caractéristiques du cépage ainsi que la qualité organoleptique du vin. On se contente en général d'un traitement concomitant au SO₂ lors du pressurage qui permet en plus de limiter le développement de la flore indigène avant le début de la fermentation, de réduire l'oxydation. Selon l'année, la période des vendanges... la flore indigène peut varier de quelques centaines ou milliers de cellules de levure /ml en début de vendange à 10⁵ /ml en pleine vendange. Principalement localisée sur les baies, leur dissémination est assurée par les insectes (9).

La microflore est qualitativement très variées (*Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Torulaspota*...) mais l'intérêt œnologique est centré sur un petit nombre d'espèces ; on distingue schématiquement 3 groupes de levures :

- ◆ levures apiculées et *S. ellipsoideus*, responsables du « gros travail » de la fermentation,
- ◆ levures d'appoint, presque toujours présentes, comme *S. oviformis*, très alcooligènes,
- ◆ levures à participation négligeable pouvant être des agents occasionnels d'altération.

C'est dans le marc que la concentration de levures est la plus grande (49, 9).

Certaines firmes tiennent à maîtriser leurs souches : conservées en laboratoire entre 2 et 4°C sur gélose, le pied de levain est obtenu par multiplication d'un tube de culture d'abord en laboratoire puis dans des installations industrielles adaptées avec du jus de raisin entre 20 et 25°C. En 10-15 jours, il est possible d'obtenir 100 hl de levain, soit 100 millions de cellules/ml à partir d'un tube de culture de 10 ml (9).

<i>Brettanomyces</i>	11	<i>Leucosporidium</i>	2
<i>Candida</i>	29	<i>Metschnikowia</i>	2
<i>Cryptococcus</i>	6	<i>Nadsonia</i>	1
<i>Debaryomyces</i>	8	<i>Pichia</i>	9
<i>Dekkera</i>	2	<i>Rhodotorula</i>	7
<i>Endomyces</i>	1	<i>Saccharomyces</i>	57
<i>Endomycopsis</i>	2	<i>Saccharomyces</i>	2
<i>Hanseniaspora</i>	6	<i>Schizosaccharomyces</i>	7
<i>Hansenula</i>	6	<i>Sphaerulina</i>	1
<i>Hyalocynodra</i>	1	<i>Sporobolomyces</i>	1
<i>Kloeckera</i>	8	<i>Torulopsis</i>	22
<i>Kluyveromyces</i>	4	<i>Trichosporon</i>	6

Tab.22 : Nombre d'espèces de différents genres retrouvées au moins 1 fois sur le raisin, le vin, le matériel vinaire, ... (9)

2.8. SUCCESSION D'ESPECES DE LEVURES

La flore oxydative (*Metschnikowia*) qui prédomine est dans un premier temps, remplacée par la flore fermentative (52).

Les levures **apiculées non sporogènes** comme *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum* pour les vendanges rouges, *Hansenula*,...) associées à *Torulopsis stellata* pour les moûts de raisins pourris assurent le départ de la fermentation alcoolique. Mais ces levures apiculées ne peuvent donner que 3 à 4° d'alcool (*Torulopsis stellata* peut aller jusqu'à 7 à 10°). De plus, elles sont très sensibles à l'anhydride sulfureux. Rapidement, les *Saccharomyces* de pouvoir alcooligène allant de 8 à 16° (vin normal) envahissent le milieu et à mi-fermentation, les levures apiculées ont disparu. *Saccharomyces ellipsoideus* prédomine à cause de sa forte intensité fermentaire et vers la fin de la fermentation, l'espèce dominante est *S. oviformis* dans les moûts riches en sucres. Cette levure, plus alcoogène que la précédente (18° d'alcool, voire plus) et moins sensible à l'alcool constitue l'espèce finisseuse ; elle est très utile pour l'achèvement des vins de degrés élevés (49, 56, 48, 52, 38, 45, 9, 56).

Saccharomyces ellipsoideus prend toujours le pas sur *S.oviformis*. Pour avoir une multiplication semblable des 2 levures, il faudrait introduire avant le départ en fermentation, 2 fois plus de levain de *S.oviformis*. La sélection de *S.ellipsoideus* est vraisemblablement liée à une intensité fermentaire plus forte plutôt qu'à un meilleur pouvoir alcooligène (49).

• Antagonisme levures/bactéries

Le développement des bactéries malolactiques dans un vin est influencé par la nature des levures qui ont conduit la fermentation alcoolique. Certaines espèces l'empêchent. Dans un milieu de fermentation, les levures sont toujours moins nombreuses lorsqu'elles se développent en présence de bactéries (10 à 20 fois moins). Quant au développement des bactéries, il est inhibé par l'alcool formé par les levures.

Les levures supplantent d'abord les bactéries jusqu'à la fin de la dégradation des sucres. Une compétition pour l'assimilation de certains substrats nutritifs serait en cause ainsi que des inhibiteurs de nature inconnue. Les acides gras pourraient être en partie responsables. Ensuite, l'enrichissement en vitamines, acides aminés et peptides par les levures stimule le développement bactérien. Enfin, on note aussi un ralentissement de la fermentation alcoolique et de la population levurienne en présence des bactéries du vin (51).

• Activité antibiotique de *Botrytis cinerea* (moisissure) sur les levures

Les moûts issus de raisins attaqués par la pourriture noble et riches en sucres réducteurs, fermentent en général difficilement. Le retard de fermentation est expliqué par la libération de substances inhibitrices et acétigènes non définies ayant été désignées sous le nom de « botryticines ». Ces substances sont détruites par l'anhydride sulfureux et par un chauffage prolongé à 120°C. Leur production est maximale de pH=3,0 à 3,5 et l'action propre de ces molécules est nettement plus forte lorsque le pH est plus élevé. La production de substances antilevures est une propriété retrouvée chez d'autres moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*) mais c'est *B.cinerea* qui en secrète le plus (49).

- **Activateurs d'origine fongique**

Ils peuvent dans une certaine mesure suppléer à une carence azotée ou vitaminique. Ils agissent à très faible dose (seul le 1/10 de la dose employée est soluble et réellement efficace) et ne modifient pas l'arôme du produit fini (49).

A l'opposé, certains composés comme les acides décanoïque et dodécanoïque, acides organiques issus du métabolisme des levures, auraient une action inhibitrice sur leur propre activité et devraient pouvoir être adsorbées sur des parois de levures (9).

2.9. ROLES DE LA LEVURE

- Elle **mène la fermentation à son terme** même sur des moûts riches en sucres (donc riches en éthanol en fin de fermentation) par des levures résistantes.

- Elle intervient dans les **précurseurs d'arômes du raisin**

La décarboxylation des acides phénols par *Saccharomyces cerevisiae* est bien connue en brasserie car elle est génératrice de mauvais goûts et odeurs. Dans le moût de raisin, les quantités d'acides phénols sont beaucoup plus faibles mais les phénols volatils produits sont fortement odorants et peuvent être impliqués dans l'arôme de certains vins (21, 23).

Candida stellata et *Torulasporea delbrueckii* affectent positivement le goût et la flaveur à coté de *S.cerevisiae* (17).

La levure intervient dans la libération d'arômes variétaux typiques à partir de précurseurs d'arômes inodores déjà présents dans le moût non fermenté (21, 23).

L'élaboration des vins jaunes du Jura a un vieillissement sous voile de levure durant 6 ans, période durant laquelle le vin acquiert une odeur de noix due à la formation d'éthanal et d'une lactone, le sotolon, produite par *Saccharomyces*. Les souches se raréfient au fil du temps. Une seule persiste au bout de 6 ans (26).

2.10. GENIE GENETIQUE, AMELIORATION DES SOUCHES (64)

Si l'amélioration des souches de *Saccharomyces cerevisiae* est aisée avec les souches utilisées en boulangerie. Il est plus difficile d'améliorer celles utilisées en œnologie car le fait d'introduire une caractéristique supplémentaire ne doit pas nuire aux autres (23).

- ◆ Souche exprimant une **endoglucanase** pour lyser les β glucanes de certains raisins qui gênent la filtration
- ◆ Souche synthétisant des **pectinases** attaquant la pectine, dont la quantité peut être très importante dans les moûts de raisin des régions chaudes. Elles nuisent à la fabrication du vin et à sa stabilité. En augmentant la viscosité des moûts, elles réduisent également la vitesse de sédimentation des particules en suspension, dont les levures. Ceci faciliterait également la libération de composés aromatiques contenus dans la peau des raisins (23).

◆ **Levures tueuses ou « killer »**

Ces souches particulières sécrètent des polypeptides toxiques pour d'autres levures de la même espèce et parfois d'un genre différent. Les cellules y sont surtout sensibles pendant la phase de croissance. La toxine « killer » est instable à la chaleur et n'est active que pour des pH compris entre 3,6 et 4,8. Elle n'est pas sensible aux doses modérées de SO₂ et à l'éthanol aux concentrations rencontrées en vinification.

L'inoculation d'un levain de levures tueuses pourrait probablement éliminer les souches sauvages sensibles. Cependant, les souches résistantes sont nombreuses. Toutefois, le génie génétique permet d'obtenir des souches à plusieurs groupes killer. Les souches résistantes sont alors moins nombreuses. L'emploi de levures killer trop performantes peut néanmoins faire courir le risque d'éliminer des souches sauvages encore inexploitées et ayant des caractéristiques intéressantes. En outre, si l'on ensemence le moût avec une souche sensible à une souche killer, il faudra augmenter la quantité de l'inoculum d'un facteur 10 à 100. C'est pourquoi on utilise préférentiellement des levures résistantes. Pourtant, le caractère killer ou résistant ne doit jamais prévaloir sur les caractéristiques œnologiques (23, 38).

Ex : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, et certaines souches des genres *Torulopsis*, *Hansenula*, *Candida* (48).

On peut légitimement s'interroger sur les risques que ce type de souches est susceptible de faire courir à l'environnement. S'il est clair qu'elle peut protéger une fermentation œnologique contre les levures « sauvages », qu'arriverait-il si elle se répandait dans la nature de façon incontrôlée ?

◆ **Levures ne produisant pas d'urée**

La génétique permet d'éviter l'expression de 2 gènes impliqués dans la production d'urée, obtenu par dégradation de l'arginine, et qui peut, en milieu alcoolique et après chauffage, conduire à la formation de carbamate d'éthyle cancérigène.

◆ **Levures productrices de terpènes**

Ces souches peuvent produire des terpènes tels que le géraniol et le linalol, substances aromatiques majeures des vins de type Muscat provenant naturellement du grain de raisin, et en aucun cas de la levure. Cependant, cette souche est incapable de croître sans apport d'ergostérol. Elle n'est donc pas adaptée à une utilisation technologique. D'autres souches ont été produites pour pallier à cette déficience (23).

◆ **Synthèse de glycérol**

Certaines souches cryotolérantes peuvent produire des taux importants de glycérol (composé le plus largement produit après l'éthanol et le CO₂, intervenant de façon importante sur la qualité de certains vins auxquels il donne du « corps », lorsque le taux dépasse 10g/l), tout en produisant peu d'éthanol. Ces capacités pourraient donc être exploitées lorsque l'on désire des vins riches en glycérol et/ou de degré alcoolique faible (23, 5).

Les chercheurs de l'INRA de Montpellier ont réussi à construire une levure génétiquement modifiée à partir d'une souche commerciale de *Saccharomyces* utilisée en vinification. Leur préparation est étonnante car les souches industrielles sont rarement adaptées aux manipulations génétiques (5).

◆ **Fermentation mixte**

Des essais d'insertion des gènes de la fermentation malolactique des bactéries lactiques (*Lactobacillus delbrueckii* et *Lactobacillus lactis*) chez les levures responsables de la fermentation alcoolique (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été réalisés. Ces 2 fermentations se dérouleraient simultanément et un seul ensemencement serait nécessaire. Le rendement des souches obtenues reste très faible (9).

Un certain nombre d'industriels disposent de souches performantes issues du génie génétique mais s'abstiennent de les utiliser car ils craignent une réaction négative des consommateurs dont les craintes sont largement infondées. Il est plus important de l'éduquer et de lui faire comprendre que l'emploi de ces souches est susceptible d'accroître la qualité des produits sans présenter, dans la plupart des cas, le moindre risque pour l'environnement.

Le génie génétique permet par ailleurs de rendre possible l'emploi de levures dans d'autres domaines : production de chymosine pour la coagulation du lait en fromagerie, levure exprimant une protéine facilitant la congélation d'une gamme étendue de produits alimentaires... (41).

3. LE CHAMPAGNE (23)

3.1. QUELQUES CHIFFRES

La consommation française de Champagne s'élevait à environ 2 l/habitant en 1993. La région Champagne n'est pas en mesure de concurrencer le Languedoc Roussillon puisqu'elle ne produit que 4% (soit 1,9 millions d'hl) de la production vinicole de 1997 (28).

Même si la Champagne n'est pas la première région viticole de France, la boisson s'est enquée d'une réputation mondiale, notamment outre-atlantique. Les ventes de champagne en France ont avoisiné les 157 millions de bouteilles pour 1996.

3.2. PREPARATION

L'élaboration du Champagne est caractérisée par l'aptitude des souches de *S.cerevisiae* ou *S.bayanus* à réaliser une seconde fermentation à 10-12°C pour amener le liquide de 11,5° d'alcool à 12,5-12,8°. Ces souches doivent supporter le remuage qui consiste à faire glisser le dépôt dans le col de la bouteille. Elles seront donc choisies selon leur capacité d'agglomération (45).

Le champagne est préparé à partir d'un vin de base auquel on ajoute du sucre de canne ou de betterave, afin de réaliser sous pression, en cuve ou bouteille (méthode champenoise), un vin mousseux (9).

La boisson obtenue a été le siège de 3 fermentations : alcoolique, malolactique et enfin, une dernière fermentation alcoolique, communément appelée « champagnisation » ou « prise de mousse ».

Les premiers vins mousseux sont apparus en Champagne vers les XVII et XVIII^{èmes} siècles, avec l'utilisation des bouteilles. La Champagne étant située dans une région septentrionale (faible maturité du raisin, froid vif de l'hiver), la fermentation responsable de la transformation du raisin en vin n'était pas terminée avant l'apparition des grands froids. Elle reprenait après la mise en bouteilles au printemps, donnant ainsi lieu à la formation de mousse. Dès lors, les Champenois s'efforcent d'obtenir une mousse régulière par un choix judicieux de l'époque de mise en bouteilles.

En 1836, François, pharmacien à Châlons sur Marne, précise la relation existant entre le poids de sucre ajouté au vin lors de la mise en bouteilles et la pression ultérieure. La compréhension complète de ce phénomène n'interviendra qu'avec celle de la fermentation alcoolique.

Cette seconde fermentation est recherchée pour la fabrication de vins mousseux. L'ajout de 4 g de sucre / litre permet le développement d'une pression d'1 atm dans une bouteille à 10°C. Ainsi, pour le champagne dont la pression se situe entre 5 et 6 atm, il faut ajouter 22 à 25 g de sucre à la mise en bouteille, ce qui permet d'accroître le titre alcoolique de 1,3 à 1,5°.

Selon la région, il existe 4 méthodes :

◆ **Méthode rurale : naturelle**

La première fermentation alcoolique est stoppée par le froid ou par filtration. Le vin est alors mis en bouteille et la prise de mousse s'opère à partir des sucres résiduels. On procède ensuite éventuellement à l'élimination du dépôt de levures par remuage et dégorgement. C'est la méthode la plus utilisée pour l'élaboration de la clairette de Die mais l'emploi de ce procédé va decrescendo car il est de maîtrise difficile.

◆ **Méthode champenoise**

Née en Champagne, elle est la seule employée pour l'élaboration des vins ayant l'appellation « Champagne », bien qu'elle ne constitue qu'une des caractéristiques de ce produit. Elle est également utilisée pour l'élaboration de certains mousseux. Le vin de base, additionné de sucre et de levures, est immédiatement mis en bouteilles où s'effectue la seconde fermentation. Après un séjour plus ou moins long sur lie, on procède au remuage des bouteilles et au dégorgement pour éliminer le dépôt de levures et rendre le vin parfaitement limpide. Le vin est commercialisé dans la même bouteille qui a servi à la champagnisation.

◆ **Méthode de transfert**

La seconde fermentation a toujours lieu en bouteille mais cette opération terminée, le vin est transféré dans une cuve sous contre - pression filtré stérilement puis remis en bouteille.

◆ **Méthode cuve close = méthode « Charmat »**

C'est la technologie la plus ancienne mais la plus avancée. La seconde fermentation est effectuée dans des cuves résistantes à la pression puis transféré par filtration dans une autre cuve avant leur mise en bouteilles. On exploite ce procédé pour l'élaboration de nombreux vins mousseux hors appellation Champagne (9).

Le principal problème de cette prise de mousse réside dans la difficulté à initier une nouvelle fermentation sur un milieu riche en alcool (10-11,5°), et appauvri en substances nutritives par les opérations précédentes (fermentations alcoolique et malolactique, traitement des vins...). Par ailleurs, le milieu est défavorable :

- ◆ pH : 3,2
- ◆ température de 10-15°C : ne permet pas d'optimiser les qualités organoleptiques
- ◆ SO₂ libre (10-20 mg/l) limitant la croissance des levures nécessaires à cette nouvelle fermentation (9).

3.3. LA CHAMPAGNISATION INDUSTRIELLE *Voir figure 24*

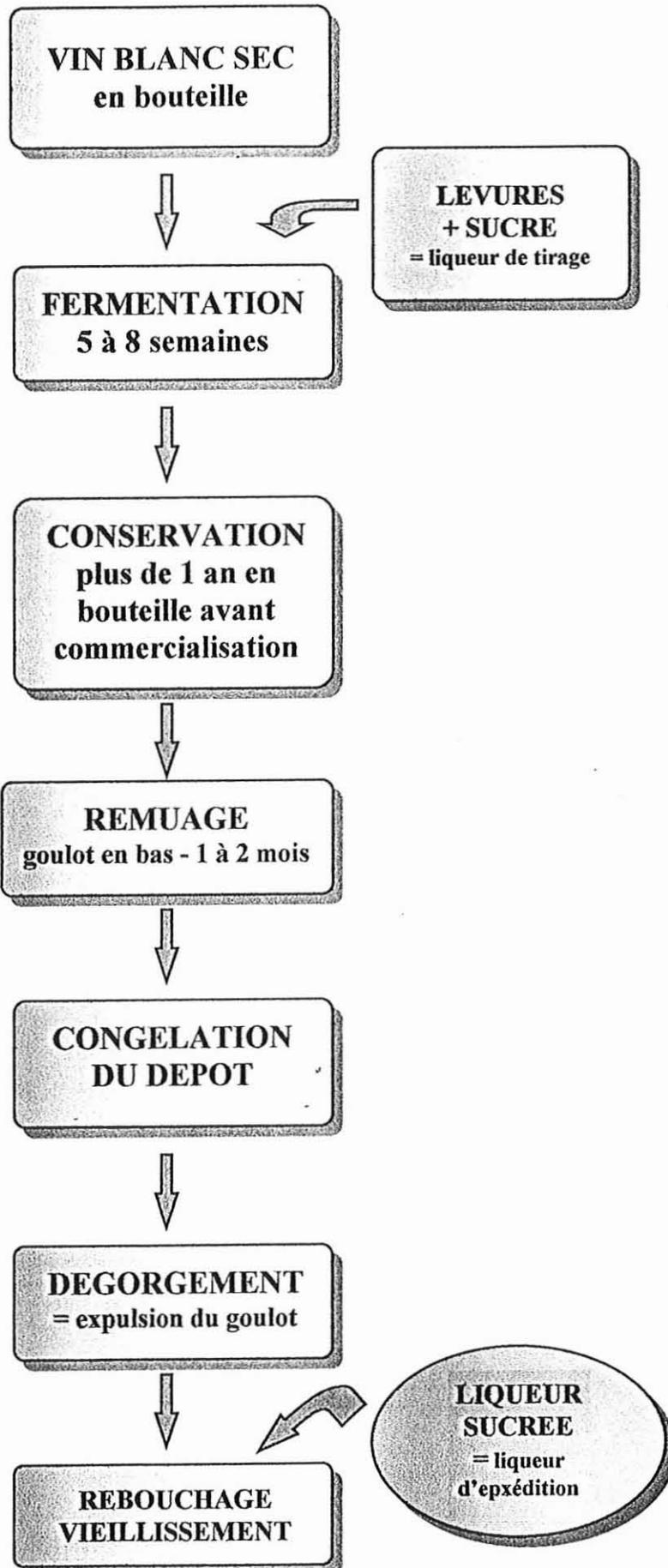
Le remuage mécanique pose des problèmes de place et de coût de main d'œuvre, d'où la recherche d'autres méthodes :

- utiliser des levures floculantes ou agglomérantes, mais les qualités organoleptiques obtenues ne sont pas satisfaisantes
- inclure les levures dans des billes d'alginate qui tombent dans le goulot en quelques minutes quand on retourne la bouteille. Ces billes retiennent les levures sans empêcher la libre circulation des sucres du vin et des produits de la fermentation.
- système de membrane en doigt de gant (millispark) s'insérant dans le col de la bouteille, où sont placées les levures. Il est expulsé après la prise de mousse (9, 41).

Fig. 24

LA CHAMPAGNISATION

(9, 56)



10-11,5° d'alcool

Levures cultivées en présence de quantités croissantes d'alcool.

La quantité de sucre est calculée pour que la pression finale de CO₂ soit de 5-6 bars.

Autolyse des levures => libération des composés aromatiques
"vieillessement sur lie"

Congélation dans une saumure à -25°C

Liqueur : ajoutée pour la préparation de champagnes qualifiés de bruts, extra-dry, secs, demi-secs, doux.

4. LE CIDRE

C'est une boisson résultant de la fermentation d'un moût sucré obtenu à partir de pommes. La microbiologie du cidre est assez proche de celle du vin : la fermentation par les levures transforme les sucres du jus en alcool. On trouve des levures apiculées (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*), des levures elliptiques (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidus* et *S.uvarum*), qui constituent la flore normale des pommes.

Le levurage n'est habituellement pas employé sauf dans les productions industrielles (38).

En France, la presque totalité du cidre est élaboré dans les régions Bretagne, Maine, Normandie ainsi qu'à l'Est du Bassin Parisien et le Nord.

Initialement, le cidre obtenu selon la méthode rurale résultait d'une fermentation lente et partielle du moût à partir de la microflore sauvage présente sur les pommes, se stabilisant en densité par carence en nutriments (vitamines, azote) réalisée par clarification pré-fermentaire.

Après dépôt des levures sous forme de lies, le cidre limpide était soutiré dans les bouteilles champenoises où il subsistait assez de levures pour permettre, par une légère fermentation, l'imprégnation en CO₂. Cette prise de mousse en bouteille a donné naissance à l'appellation « cidre bouché ».

La boisson finale était pauvre en alcool, de saveur fruitée et très aromatique, effervescente, et comportait quelques sucres résiduels. La limpidité plus ou moins parfaite était fonction de la réussite de la clarification pré-fermentaire et du développement microbien ultérieur dans la bouteille. Aujourd'hui, la cidrerie industrielle s'écarte de ce procédé car elle doit commercialiser un produit de qualité régulière tout au long de l'année. On pratique dorénavant le levurage au moyen de souches sélectionnées (*Saccharomyces*) sous forme de **levain liquide, levures lyophilisées** ou **L.S.A** (45, 9).

;

Il existe 2 positions extrêmes :

- la Grande Bretagne, le principal producteur, de tradition brassicole, où le cidre est élaboré par fermentation d'une **dilution** de concentré inoculé par une souche pure de levure. Le produit est conditionné après de multiples traitements de stabilisation.
- l'Espagne, de tradition vinicole, où le « cidre naturel » est le résultat de la fermentation du **pur jus de presse** par la microflore présente dans la cave. La mise en bouteille a lieu sans aucune autre manipulation.
- Les autres pays comme la France ont une position intermédiaire puisqu'ils tendent à réduire la fermentation au moyen d'une flore mélangée car il y a peu de doute que la fermentation à faible température d'un moût non clarifié pauvre en nutriments, produise plus d'arômes que ne pourrait le faire la fermentation rapide d'un moût riche en nutriments (9, 64).

4.1. LE MILIEU

Par pressurage de variétés de pommes à cidre, on obtient le jus (ou moût) plus ou moins pur. Il diffère qualitativement peu de celui du raisin. Les rapports sucre/acidité et tanins/acidité permettent le classement des variétés de pomme : amère, douce amère, douce, acidulée et aigre. On utilise essentiellement les catégories : saveur douce, douce-amère et amère (9).

Sucres	100 à 150 g/l
Acide L malique	4 à 6 g/l
Acide tartrique	0
Azote	130 mg/l d'azote total Peu de proline Selon la fumure azotée des vergers

Tab.23 : Composition du moût de pommes à cidre (9)

Parmi les acides aminés, cinq d'entre eux représentent 86 à 95 % des acides aminés totaux et sont immédiatement consommés par la levure. Les fruits de vergers fortement azotés en possèdent 2 à 5 fois plus.

La consommation des acides aminés par les levures rend le milieu moins favorable au développement de bactéries dans les 2 premières semaines de fermentation; en outre, elles en excrètent certains (acide glutamique, valine) qui sont essentiels à leur développement (9).

4.2. MICROFLORE LEVURIENNE

Avec 3 espèces principales (*Saccharomyces cerevisiae (uvarum)*, *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*), la population de *S. cerevisiae (uvarum)* devient prédominante au cours de la fermentation alcoolique pour atteindre son maximum quand 50% du sucre est consommé. Cependant, les autres espèces coexistent et reprennent proportionnellement de l'importance quand l'activité de cette dernière diminue.

Au cours de la fermentation, une diminution spontanée ou provoquée de la population de *Saccharomyces* peut favoriser l'implantation de *Brettanomyces anomalus*, responsable des caractéristiques sensorielles de certains cidres. Par ailleurs, des traitements comme l'addition d'anhydride sulfureux au moût (fort usité en Grande Bretagne) inhibe la majorité des levures oxydatives et faiblement fermentatives, favorisant ainsi le développement et l'action de *Saccharomyces*. La population totale de levures varie de façon importante selon les traitements du moût et surtout selon les conditions de fermentation, notamment la teneur en sucre (45, 9, 48).

La flore évolue au cours de la fermentation du moût de pomme : d'abord prédominant les levures à faibles pouvoir fermentaire et peu résistantes à l'éthanol (genres *Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*). Puis l'anaérobiose s'établissant, elles laissent la place à des levures du genre *Saccharomyces*, mieux adaptées à l'éthanol et pouvant assurer la totalité de la fermentation des sucres (45, 48).

Comme en œnologie, la souche utilisée ou la succession de flores interviennent sur les qualités organoleptiques du produit (45).

4.3. SELECTION DES SOUCHES

La situation idéale est l'utilisation de souches

- faciles à cerner : vitesse de fermentation, degré d'atténuation, tolérance à l'éthanol...
- non productrices de mauvaises odeurs : H₂S, odeur de souris
- à l'origine de l'arôme typique du cidre (alcools supérieurs, esters).

Ces deux derniers critères sont bien évidemment plus difficiles à cerner (9).

Du point de vue économique, il apparaît préférable d'utiliser des souches du genre *Saccharomyces* en L.S.A.. Cependant, la microflore naturelle a une grande influence sur les caractéristiques physico-chimiques et sensorielles du produit (9).

4.4. CONTROLE DE LA FERMENTATION

Le but de ce contrôle est de conserver un cidre riche en sucres en ralentissant la fermentation alcoolique par différents procédés :

1. Clarification,
2. Ajout de SO₂ : au Royaume Uni, par sulfitage du substrat fermentaire préalablement acidifié, on élimine les levures non *Saccharomyces* puis on inocule avec une souche pure de *Saccharomyces*. La capacité fermentaire, rapide et totale, est ajustée par addition de thiamine et sulfate d'ammonium.
3. Elimination de biomasse par centrifugation ou filtration (9, 64).

5. LE SAKÉ (64, 70, 48)

Le Saké est une boisson traditionnelle, consommée depuis longtemps au Japon, dont la première apparition remonte aux mythes japonais, et la manière moderne de le préparer existe depuis le XVII^{ème} siècle.

Boisson translucide et sans couleur (ou un peu jaune), il contient en moyenne 15 % d'alcool.

Selon une statistique parue en 1993, le saké est la 2^{ème} boisson consommée au Japon après la bière. La quantité exportée chaque année s'élève à près de 20.10⁶ litres, soit l'équivalent de ce qui est consommé en 2 mois à Tokyo.

Le terme « Kuramoto » désigne aussi bien le brasseur que la brasserie de saké. On trouve environ 2 000 brasseries de saké au Japon. Certaines sont très grandes et fabriquent du saké de manière industrielle. Mais la plupart d'entre elles sont de petites fabriques, qui produisent moins de 20 000 litres de saké par mois.

5.1. PROCEDE DE FABRICATION

Voir figures 25, 26

La fabrication du saké ressemble plus à celle de la bière qu'à celle du vin, car la levure doit d'abord disposer d'assez de sucre pour créer l'alcool ; en effet, la levure de bière, ou levure de saké, ne peut faire naître l'alcool à partir de l'amidon.

5.1.1. Matières premières

A la base, le saké n'est que du riz et de l'eau.

Le **riz** utilisé est différent de celui que l'on mange : avec de l'amidon plus dense au centre du grain, il est plus blanc et moins translucide. D'ailleurs, le riz à manger ne convient pas.

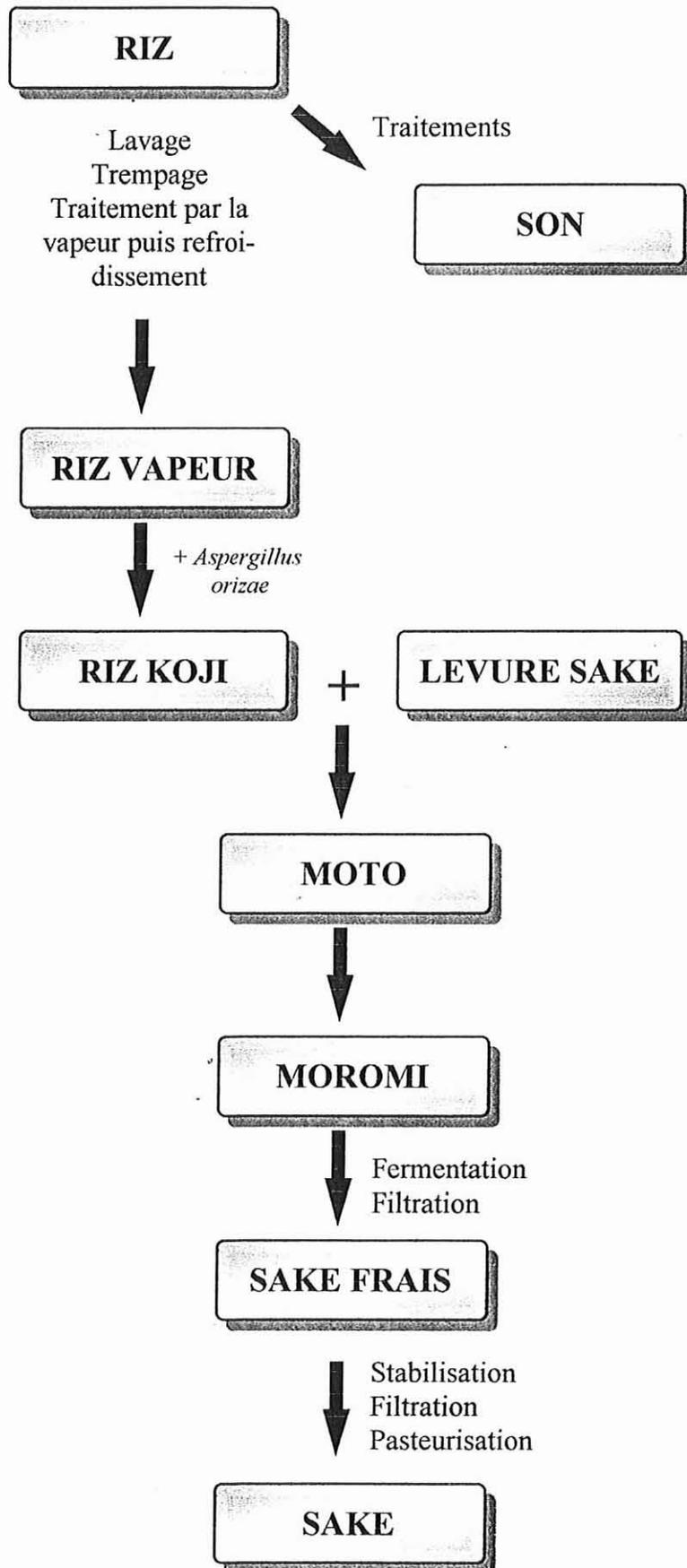
Le grain de riz doit avoir une amande souple pour permettre la pénétration du mycelium de la moisissure (*Aspergillus orizae*).

L'**eau** aussi est importante. Autrefois, on utilisait aussi bien l'eau d'une rivière ou d'un lac, mais aujourd'hui on utilise de l'eau d'origine souterraine (« eau de forage ») qu'on filtre avant de l'utiliser, afin de retirer la quasi totalité du fer et du manganèse qui altèrent la qualité du produit final.

Il est de rigueur d'employer une eau neutre ou faiblement alcaline.

Dans la fabrication traditionnelle, on n'utilise que les **ferments** en suspension dans l'air. Mais de nos jours, pour économiser les coûts et le temps de fermentation, on utilise souvent de la levure de saké vendue dans les fabriques de saké.

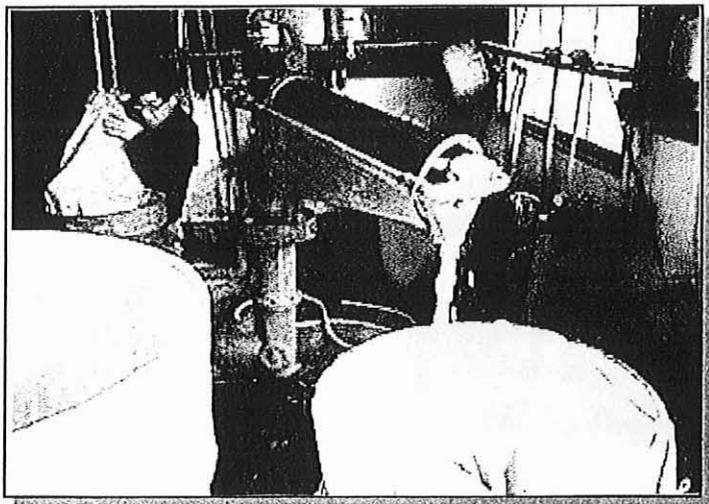
Fig.25 FABRICATION DU SAKE (64)



La Fabrication du Saké en images

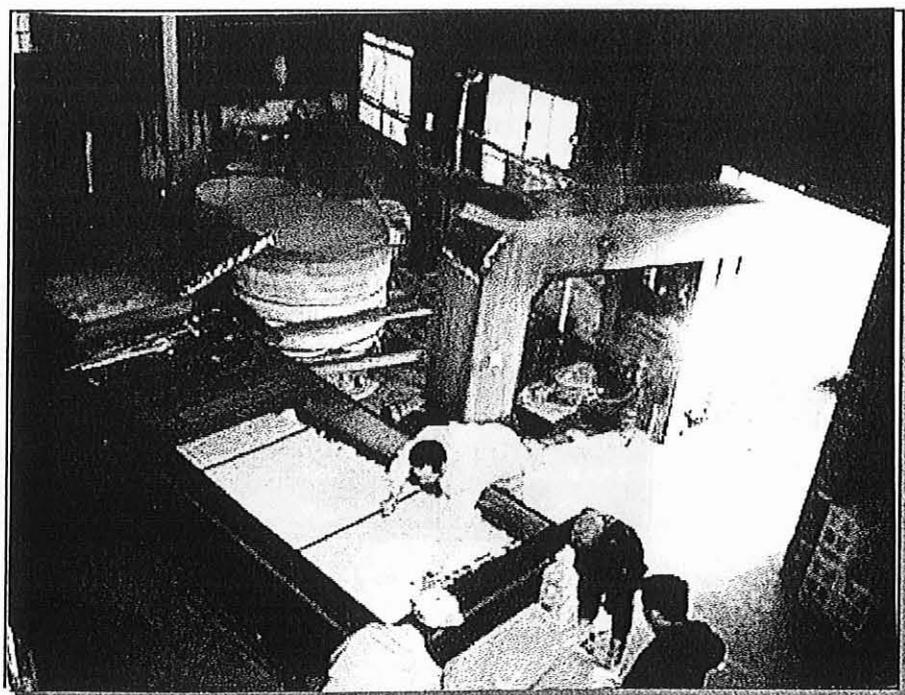
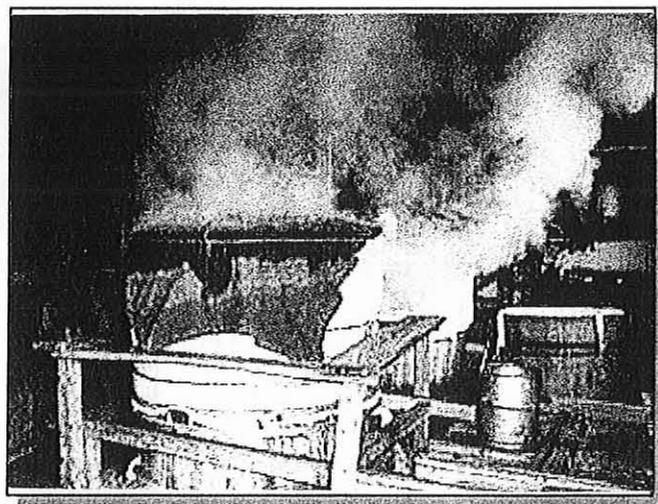
Fig.26

(70)



Le riz pré-traité est lavé à l'eau...

puis chauffé à la vapeur

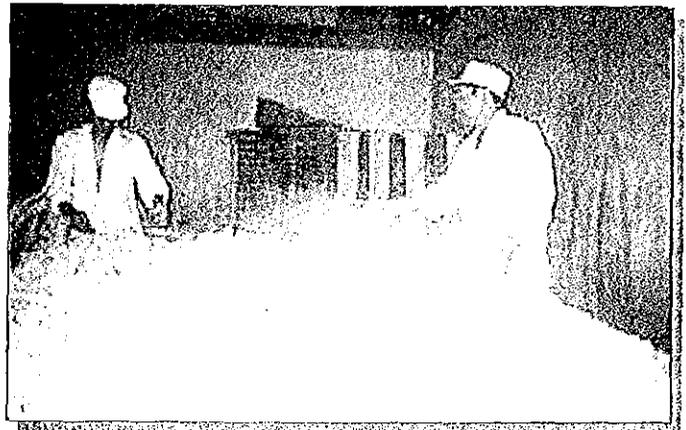


et refroidi.

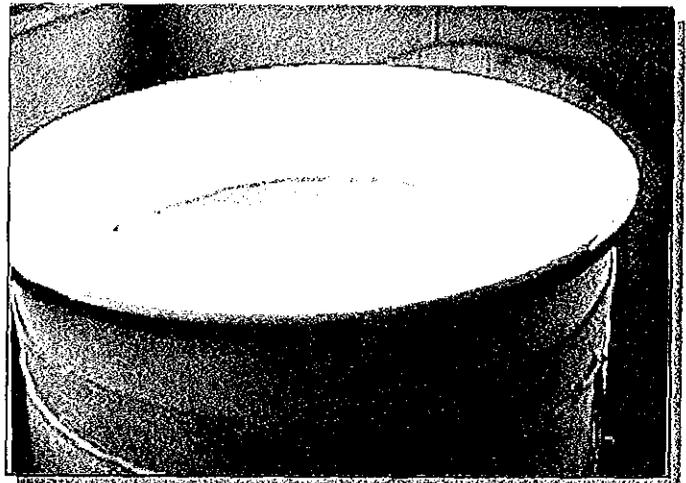


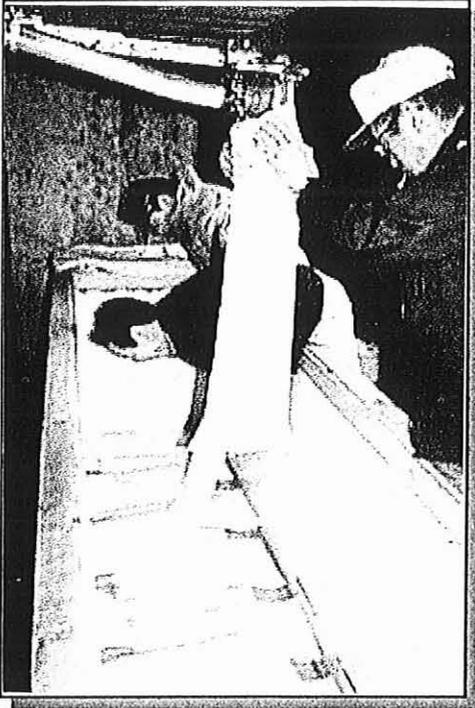
Le saké est un mélange de...

Koji : riz vapeurensemencé par un champignon



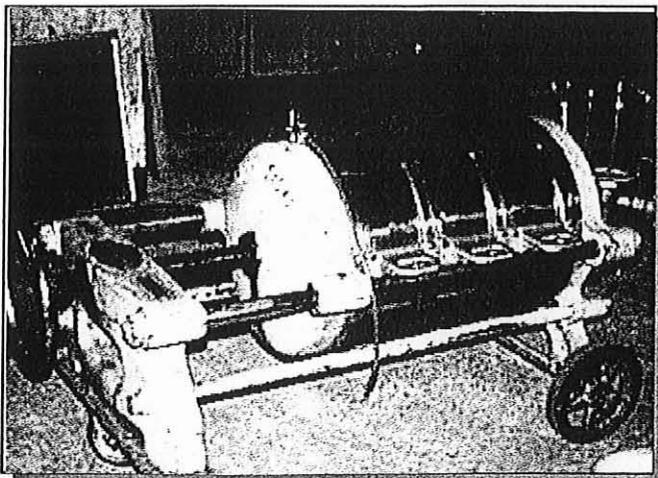
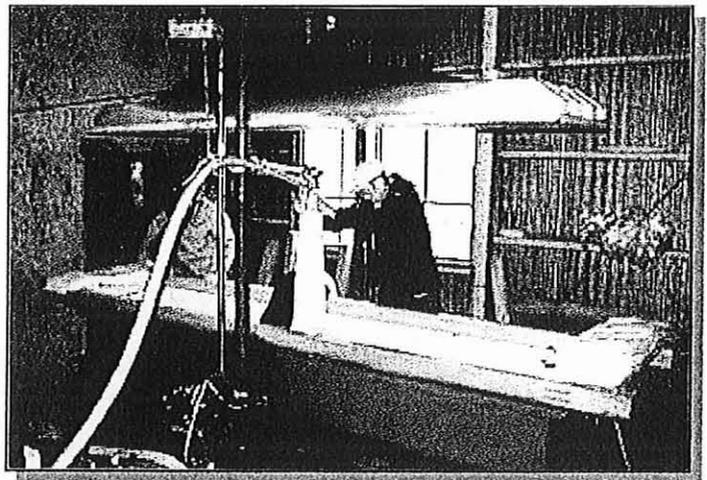
Moto : Kojiensemencé par de la levure de saké





Après fermentation, la poudre est mise en sacs...

et ces sacs dans des presses, afin d'extraire la phase liquide.



Le liquide repose 10 jours, puis on en filtre sa partie supérieure grâce à une filtreuse carbonique.

Enfin, le liquide filtré est chauffé (60-65°C) : le saké est né.

5.1.2. Protocole

La première opération consiste à retirer l'enveloppe dure (péricarpe) du grain de riz à saké. Puis, on épluche jusqu'à 65 % de la surface : il ne reste que la partie centrale du grain. Enfin, on le lave à l'eau et on le laisse tremper quelque temps, puis on le chauffe à la vapeur et on le refroidit.

Ensuite, on prépare le **koji** résultant de l'ensemencement de riz cuit à la vapeur par une moisissure, *Aspergillus oryzae*. Ce champignon permet l'hydrolyse de l'amidon du riz en sucres simples. Il meurt dans la masse poudreuse en fermentation en raison du manque d'oxygène.

L'ajout de **levure de saké** au **koji** conduit au « **moto** », le koji permettant d'accélérer la culture des levures. On laisse fermenter ce mélange environ 1 mois entre 10 et 15°C.

5.1.3. Fermentation

La levure présente dans la poudre en fermentation transforme le glucose et le fructose en alcool. Les transformations du riz en sucre et du sucre en alcool progressent parallèlement. Avec cette méthode de fermentation, le saké peut atteindre 20 % d'alcool, ce qui est un maximum pour les boissons fermentées.

Les levures starters sont ajoutées à une température de 12-13°C. Après 1 jour, la population levurienne est d'environ 10^8 cellules/g, donc une population quasi similaire à celle du moromi.

La fermentation en elle-même débute lentement le second jour. La température du mélange est progressivement refroidie jusqu'à 7-8°C au 4^{ème} jour afin de réduire les risques de contamination, jusqu'à ce que la population de levure et la concentration d'acide lactique du moto soit suffisante.

∴ Après 3 à 4 jours, le degré alcoolique est de 3-4 %.

L'activité fermentaire devient plus vigoureuse avec une élévation de température : on approche $2,5 \cdot 10^8$ cellules de levure/gramme.

Comme les concentrations d'acide et d'alcool croissent, la mousse devient moins dense. La température atteint 13-18°C en 6 à 9 jours ; elle est maintenue à ce niveau 5 à 9 jours après quoi elle décroît alors que la concentration d'alcool atteint 17,5 à 19,5 % et que la fermentation cesse.

Après fermentation, le moromi (purée) est mis au repos quelques jours puis filtré sous pression en présence de charbon activé afin d'obtenir un liquide clair. Ce dernier sera pasteurisé après un repos de 30 à 40 jours, puis embouteillé.

De l'alcool à 30-40 % est habituellement ajouté au produit obtenu à 20-22 % d'alcool en final. D'autres composants peuvent être ajoutés, tels que le glucose, les acides lactique, succinique et du sodium glutamate, afin de rendre la qualité du saké la plus uniforme possible.

5.2. MICROFLORE

Historiquement, la purée de moto provenait d'une fermentation précédente. La levure isolée de ce mélange au XIX^{ème} siècle, responsable de la fermentation du saké, a été baptisée *Saccharomyces sake* par YABE. Mais la distinction entre *S.cerevisiae* HANSEN et *S.sake* YABE est complexe. Certains ont donc proposé, pour « levure saké », le nom de *S.cerevisiae* var.*sake* car :

- la résistance à la cycloheximide est limitée à certaines espèces de *Saccharomyces*,
- la levure saké a pour seul habitat la purée de saké.

La levure saké se distingue de la levure de panification, distillerie ou œnologie qui nécessitent de la biotine mais pas nécessairement de l'acide panthoténique, alors qu'elle, en a dans la majorité des cas besoin.

La tolérance à l'éthanol de la levure saké atteint 20-22 %.

La contamination par des souches sauvages est le problème de l'industrie du saké car il en résulte une fermentation plus lente et une qualité inférieure du produit obtenu. Cependant, la majorité de ces levures contaminantes sont sensibles aux toxines killer.

Les levures ne sont pas les seuls micro-organismes présents dans le moromi. En effet, des bactéries lactiques, en abaissant le pH, permettent à la levure de réaliser la fermentation (45).

6. BOISSONS DISTILLEES

Les boissons distillées, obtenues par distillation de vins ou de fruits fermentés, apparaissent avec la conception de l'alambic dont le principe est basé sur la différence de richesse en substances volatiles existant entre les différentes phases liquide et vapeur d'un produit chauffé.

Le premier alcool, dénommé « eau ardente » puis « eau de vie » avait un caractère pharmaceutique et était réservé à l'usage médical.

Au cours des XVI et XVII^{èmes} siècles, on tente d'atténuer les goûts désagréables des boissons obtenues par l'addition d'aromates (épices, herbes pour le gin et la vodka). Mais l'art du distillateur permettra, au fil des siècles, d'obtenir aussi de l'eau de vie à partir de produits fermentés sans additions aromatiques étrangères.

Pour l'élaboration de ces eaux de vie naturelles, il y eut d'abord la distillation de boissons fermentées existantes (vin, bière, cidre, hydromel...) puis la mise en œuvre de substances végétales sucrées pour la création de nouvelles eaux de vie : fruits, canne à sucre, mélasse de sucrerie, marcs de vinification... Certaines sont obtenues par macération des fruits frais ou partiellement fermentés (framboises, mûres, mirabelles...).

La distillation produit un alcool de degré élevé (62 à 85 % vol) mais pour être acceptable au palais, il faut effectuer une réduction de ce degré à l'eau distillée jusqu'à un taux commercial légal de 40 % à 50 % vol en France.

Les eaux de vie doivent également subir une maturation en fûts de chêne (whisky, rhum), en cuves ou bonbonnes de verre, selon que l'on désire ou non bénéficier d'oxydation et d'un complément d'aromatisation particulier dénommé goût de boisé (9, 45).

6.1. LE MILIEU

Pour la production d'alcools de bouche, tout ce qui est fermentescible a été distillé avec plus ou moins de succès commercial : fruits (raisins, pommes, poires, petits fruits, fruits exotiques...), céréales (orge, maïs, blé, seigle, riz...), canne à sucre et dérivés (sirop et mélasse de sucrerie), pomme de terre, sève de végétaux (palmier, agave), miel... (9).

Le **rhum** est obtenu à partir du jus de canne à sucre (le vesou) ou de mélasse de sucrerie de canne. Il se compose pour une grande part de glucose, levulose, saccharose, fermentés par les micro-organismes. Cependant, un apport d'azote sous forme de sulfate d'ammonium est néanmoins nécessaire à l'obtention d'une fermentation complète.

Alcools de grains :

Le **whisky** et la **vodka** quant à eux sont obtenus par fermentation de céréales diverses (orge, maïs, blé, avoine) qui contiennent principalement de l'amidon, composé qui n'est pas directement fermentescible. Il faut nécessairement le dégrader à l'aide d'amylases provenant soit de végétaux (orge maltée ou malt dans le cas du whisky et de la vodka), soit de micro-organismes (*Aspergillus oryzae* pour l'alcool de riz).

Alcools de fruits :

Globalement, les raisins et les fruits, par leur richesse en monomères de glucose et levulose (ils ne comportent que peu de saccharose), sont fermentés sans difficulté par les micro-organismes utilisés (9, 48).

6.2. MICRO-ORGANISMES IMPLIQUES

Ils sont choisis pour fournir un rendement maximal en alcool tout en préservant la saveur et l'arôme caractéristiques de la boisson.

Les levûres restent prépondérantes dans l'élaboration de ces boissons alcoolisées distillées. *Saccharomyces cerevisiae* est particulièrement développée, soit naturellement, soit par ensemencement (9).

Boisson	Micro-organismes rencontrés
Cognac	Alors que les raisins sont essentiellement colonisés par les genres <i>Hanseniaspora</i> et que le début de fermentation fait intervenir des levures non sporogènes telles que <i>Kloeckera</i> , <i>Metschnikowia</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> et <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> devient largement majoritaire en fin de fermentation (<i>S.uvarum</i> , <i>S.capensis</i> , <i>S.chevalieri</i> , <i>S.rosei</i> , <i>S.globosus</i>) même s'il ne représentait que 10 % de la flore initiale.
Vins jeunes de Charente	<i>Saccharomyces bayanus</i> prédomine mais d'autres espèces se développent après fermentation en formant un voile superficiel : <i>Candida valida</i> , <i>Hanseniaspora anomala</i> et <i>Pichia kluyveri</i> .
Whisky	Sa préparation nécessite la sélection de souches capables de supporter des taux élevés d'éthanol (12 à 15 % vol) et d'hydrolyser le maltotriose et le maltotétraose en glucose pour optimiser la transformation de l'amidon en éthanol.
Jus de canne et de mélasse	Ils comportent surtout <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mais on retrouve également d'autres espèces : <i>S.aceti</i> , <i>S.chevalieri</i> , <i>S.ludwigii</i> , <i>Pichia</i> , <i>Hansenula</i> , <i>Candida</i> , <i>Kloeckera</i> .
Eaux de vie de fruits	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> est majoritaire.

Tab 24 : Micro-organismes rencontrés dans quelques boissons (9, 45)

Le critère principal de sélection des souches sera un meilleur rendement alcoolique. Sans doute de manière plus significative que pour le vin ou le cidre, l'espèce de levure sélectionnée aura un rôle essentiel sur la saveur par les produits secondaires issus de la fermentation alcoolique (45).

6.3. FERMENTATION INDUSTRIELLE ET LEVURAGE

La technique artisanale ou familiale préfère la fermentation par ensemencement naturel, c'est à dire due à la flore microbienne d'environnement. Malgré de très bons résultats, ils sont néanmoins aléatoires et ne permettent pas une production industrielle.

Pour cette dernière, on maîtrise les paramètres physiques de la fermentation (température et aération) et on ensemence des levures isolées et sélectionnées à partir de substrats naturels.

Il existe plusieurs schémas de levurage qui ne seront pas envisagés ici.

Les procédés utilisés pour la fermentation industrielle visent à obtenir des produits à distiller de qualité, c'est à dire ayant conservé tout leur potentiel alcoolique et aromatique. Pour cela, on essaie de favoriser au mieux la prédominance levurienne vis à vis des contaminations bactériennes qui peuvent être importantes compte tenu de la qualité des matières premières utilisées (9). D'autre part, la présence simultanée de bactéries peut influencer, selon les souches, des paramètres tels que le degré alcoolique, le temps de fermentation, l'acidité (53).

6.4. CAS PARTICULIER DU RHUM

De nos jours, la plupart des fermentations sont réalisées par une souche introduite par l'homme : *Saccharomyces cerevisiae*. Elle a progressivement remplacé les levures scissipares du genre *Schizosaccharomyces* qui, malgré leur présence naturelle dans le milieu, se développent lentement, permettant aux bactéries de se multiplier simultanément et de nuire dans la plupart des cas à la qualité du rhum. Cependant, pour la fabrication du rhum « grand arôme » en Haïti et aux Antilles Françaises à partir de mélasse, le développement bactérien est souhaité et on utilisera volontairement *Schizosaccharomyces pombe* (très osmophile et résistant à une acidité élevée). Son développement est favorisé par l'apport de vinasses qui assurent une forte pression osmotique et de ce fait limite la multiplication d'autres types de levures. Sa croissance lente, due à son mode de multiplication par scissiparité, permet le développement bactérien. L'ensemencement par *Saccharomyces cerevisiae* peut se faire soit par le développement d'une **souche pure avec un appareil à levain**, soit par l'utilisation de **levures sèches actives** qui sont directement introduites dans le milieu, ce qui évite tous les stades pré-fermentaires sujets à des contaminations. En outre, ils nécessitent peu d'investissements matériels. L'existence d'un caractère « killer » chez ces souches limite encore plus ce risque de contamination. Cette méthode est donc la technique de choix des distilleries même si elle nécessite l'achat régulier de grandes quantités de levures (9, 38, 53).

Le suivi de la quantité d'alcools supérieurs et d'acétate d'éthyle dans les rhums, permet d'effectuer un contrôle qualité sur le produit (53).

PARTIE II

Chapitre II

PRODUCTION DE BIOMASSE LEVURIENNE

VIVANTE

1. Production
2. Le pain

1. PRODUCTION DE BIOMASSE VIVANTE : les FERMENTS

1.1. GROUPES INDUSTRIELS (26, 34, 35)

L'industrie française de la levure approvisionne la totalité du marché français et tient une place de premier rang au niveau mondial.

En 1996, on compte 4 usines : Groupe Lesaffre à Maisons-Alfort (Springer), à Strasbourg (Fala), à Marcq en Baroeul et celle du groupe Gist Brocades à Prouvy.

Le groupe **Lesaffre** occupe la première position dans le secteur d'activité de la levure de panification, et assure la diffusion de ses 3 principales marques de levure fraîche, l'Hirondelle, Springer et Fala dans les boulangeries françaises à partir de Maisons-Alfort et Strasbourg. Dans le monde, le groupe Lesaffre occupe également la première place dans l'industrie de la levure. Les usines de levure fraîche Lesaffre, en travaillant jour et nuit et cela pendant toute l'année, sont aujourd'hui dimensionnées pour approvisionner l'Europe au sens large, et sa levure sèche est vendue dans plus de 170 pays. De plus, ils offrent des conditionnements adaptés à tout type de clientèle : sacs de 25 kg pour les industriels, cubes de 42 g pour la ménagère (8).

Domaine d'application des levures produites	Firmes
Multifilière	Arnaud Bial Biospringer Innovia Brenntag Gist Brocades Lesaffre
Fromagerie, produits laitiers	Wiesby Texel SBI CHR Hansen France SKW Biosystems
Produits carnés	Soussana Wiesby Texel
Boulangerie, viennoiserie	Wiesby BEG Lesaffre Gist Brocades
Vin	Biospringer Gist Brocades Bioprox Red Star Bioproduct
Légumes et condiments, jus de fruits	Wiesby

Tab.26 : Usage des biomasses produites (34, 35)

Référence incontestée dès sa création en 1872, **Fould Springer**, devenue en 1972 filiale du groupe Lesaffre, a développé depuis une quarantaine d'années une activité de production et de commercialisation d'extraits de levure, de levures autolysées, de levures sèches alimentaires et de levures œnologiques. C'est en 1990 que cet ensemble d'activités a acquis sa propre identité au travers de la société **Bio Springer**. Il existe 2 unités de production (l'une à Maisons Alfort depuis 1872, l'autre à Strasbourg depuis 1994) contre 20 sites industriels du groupe Lesaffre dans quasi tous les pays du monde (11).

FALA, Fabrique Alsacienne de Levure et Alcools, fondée en 1920, implantée à Strasbourg, s'associe à Lesaffre et C^{ie} en 1968 pour former la Société Industrielle de Levure, **SIL FALA**, qui produit 100 000 tonnes de levure/an (en 1994) (14).

1.2. PRODUCTION (8, 65, 14)

Le but est d'obtenir en très grandes quantités des cellules vivantes, capables d'assurer la fermentation aux dépens des sucres du milieu et de conserver cette faculté pendant plusieurs semaines, dans de bonnes conditions d'entreposage au froid.

Les 300 g de levure mère du départ fournissent 180 tonnes de levure en 60 – 70 heures.

Le principe reste constant : il faut produire, en aérobiose, à partir d'une culture pure dénuée de toute bactérie ou levure sauvage, une quantité suffisante de levure pour ensemercer l'étape suivante. En effet, l'arrivée d'un contaminant, à quelque étape que ce soit, serait fatale au produit étant donné les taux de multiplication ultérieurs. Cette réalisation nécessite une série de récipients de volumes croissants.

Un écart sensible sur le taux moyen de multiplications en fin de schéma permet de distinguer les levures dites de qualité « normale » très stables, des levures de « haute activité » mais très instables.

1.2.1. Substrats (64)

Les mélasses de betterave ou de canne sont un substrat de choix sur les plans économiques et techniques (52).

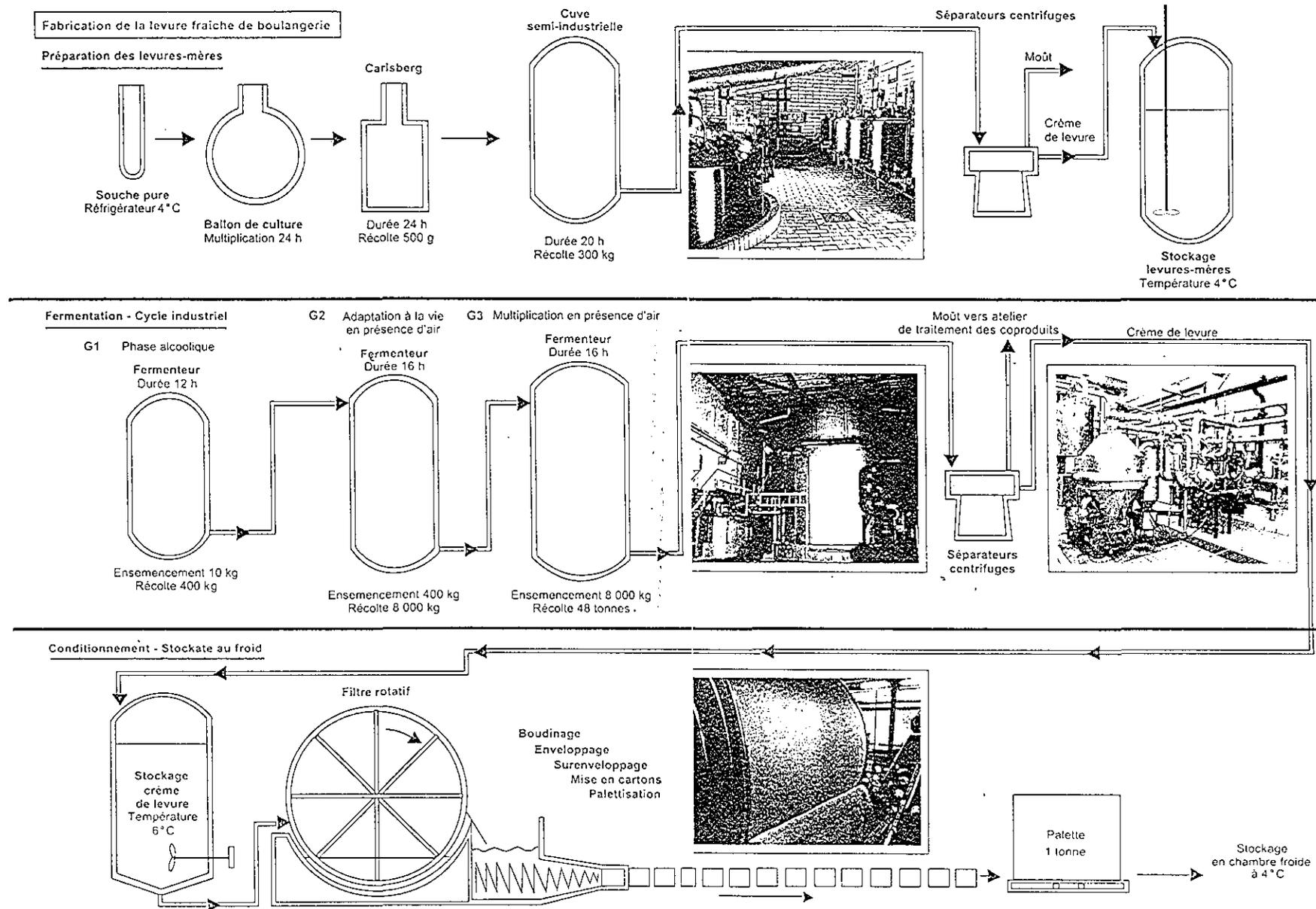
La mélasse de canne est riche en biotine mais donne des levures plus foncées, contrairement à celle de betterave dont la supplémentation est nécessaire (52).

Liquides visqueux très colorés, elles comportent 45 à 55% de M.S. de saccharose, ainsi que vitamines, minéraux et oligo-éléments. L'apport d'azote ammoniacal assimilable est nécessaire (l'azote organique présent l'étant peu).

Leurs inconvénients relèvent plus de la présence de toxiques : fongicides, ammoniums quaternaires, sulfites, excès de sodium, et nombre d'autres éléments à l'état de traces. A ce titre, il est possible d'utiliser d'autres substrats tels que le lactosérum de fromagerie ou les eaux résiduaires de papeterie (cf. P.O.U.). Néanmoins, ces derniers nécessitent une hydrolyse préalable des glucides pour les rendre assimilables par la levure (52).

L'analyse de chaque lot sera donc nécessaire avant utilisation, et l'on procédera au mélange de 10 à 12 mélasses de provenances différentes pour tenter d'uniformiser la composition.

Photo 6 : Fabrication de levure fraîche de boulangerie (8)



Pour une souche déterminée, le producteur s'intéresse à des critères qualitatifs :

- ◆ pouvoir fermentaire dans une application précise (pâte « normale », sucrée, acide...)
- ◆ nature du produit fini : levure pressée, sèche à réhydrater ou instantanée
- ◆ stabilité du pouvoir ferment

et des critères économiques

- ◆ rendement : pourcentage de levure obtenue par rapport au substrat utilisé
- ◆ productivité : vitesse de multiplication et utilisation optimale du matériel

La production de 100 g de biomasse de levure nécessite : 200 g de sucre, 100 g d'oxygène, 10 g d'ammonium (45).

La SIL FALA consomme plus de 120 000 tonnes de mélasse/an à raison de 1,2 tonnes pour la production d'une tonne de levure (14).

1.2.2. Procédé de fabrication Lesaffre (voir photo.6)

Une souche soigneusement sélectionnée est placée dans un milieu nutritif très riche qui rendra possible une première multiplication. 24 heures après, les levures sont placées dans un nouveau récipient où elles se multiplient à nouveau pendant 24 heures. On dispose alors de 500 g de levure. Après centrifugation, la levure est stockée dans une cuve réfrigérée et contrôlée. Elle constituera alors la « levure mère », d'ensemencement, qui démarrera les fermentations industrielles.

Le cycle industriel proprement dit débute avec le transfert de 10 kg de levure prélevés dans la culture mère, dans une cuve où elle va se développer en présence d'une quantité limitée d'oxygène, ce qui permet d'obtenir une grande vitesse de multiplication et des levures adaptées aux phases ultérieures. A la fin de cette phase, qui a duré 12 h, la cuve contient déjà 400 kg de levure. On les transfère dans une nouvelle cuve où l'on va progressivement les adapter à une vie aérobie. L'alimentation en mélasse et autres substances nutritives est continue. On insuffle des quantités croissantes d'air. Au bout de 16 h, on récolte environ 8 tonnes de levures avec lesquelles onensemence une ou plusieurs cuves de fermentation pour une 3^{ème} phase qui produira la levure destinée à la commercialisation.

La propagation (ou multiplication cellulaire) a donc lieu en 2 étapes :

1. augmentation massive de la population cellulaire pour pouvoir ensemer la génération finale dite « commerciale »
2. puis multiplication de la levure en lui conférant une composition biochimique et un état physiologique répondant aux besoins de l'utilisateur et du producteur en agissant sur certains paramètres (teneur en azote, phosphore, pH...)

Les conditions de cette dernière phase sont très maîtrisées : apport continu de tous les éléments nécessaires en concentration déterminée :

- ◆ Mélasse,
- ◆ Phosphate d'ammonium et ammoniaque : satisfont les besoins en azote et phosphore de la levure.

L'apport en azote diffère selon la destinée de la levure :

- il est conséquent afin d'augmenter la concentration intracellulaire en azote de la levure pressée permettant ainsi une survie acceptable,

- au contraire, il est limité dans la fabrication des L.S.A ou L.S.I., sous peine de rencontrer des difficultés de séchage et une moindre fermentation, d'où la nécessité d'accroître la dose de levure utilisée.

◆ Aération intense

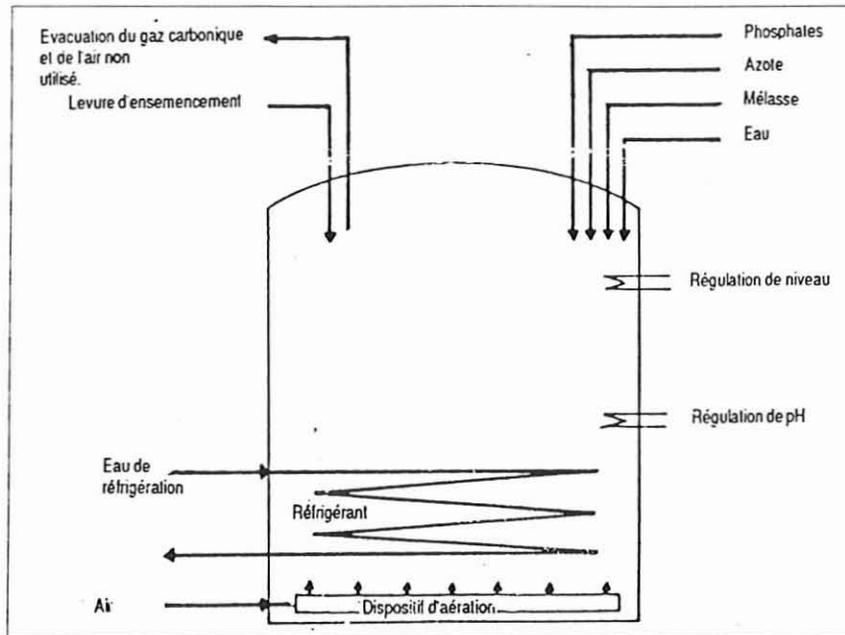


Fig. 27 : Fonctionnement d'une cuve de fermentation (65)

Dans chaque cuve, on sextuple la quantité de levure en 16 heures. Ainsi, 44 heures après l'ensemencement, des 10 kg de levure mère, on obtient 48 tonnes !

Précautions

- ◆ Tout récipient et toute matière première (y compris l'air introduit) utilisé doit être stérilisé pour éviter une contamination par des germes indésirables.
- ◆ En outre, on règle avec précision le degré d'acidité (pH) des cuves de fermentation ce qui contribue à lutter contre le développement de bactéries.
- ◆ Il faut maintenir la température de la cuve à 30°C grâce à une réfrigération très active car la production de levure est très exothermique.

La multiplication se produit par bourgeonnement des cellules mères. Toutefois, les industriels levuriers orientent leur production de manière à limiter le nombre de bourgeons non séparés des cellules mères en fin de récolte, et favoriser ainsi une bonne stabilité du produit (8, 65).

Récolte, conditionnement

Quand la multiplication d'une cuve est terminée, la centrifugation assure la séparation de la masse cellulaire en suspension du liquide ambiant, appelé moût. La suspension de levure, ou « crème de levure » est lavée sur centrifugeuses et refroidie instantanément à 6 ou 8°C puis stockée dans des cylindres de garde en attendant le conditionnement.

Ce dernier débute par la filtration de la crème sur filtre rotatif sous vide, très avantageux par rapport aux anciens filtres presses discontinus car ils améliorent considérablement la productivité et la qualité.

Fonctionnement du séchage par filtre rotatif continu sous vide

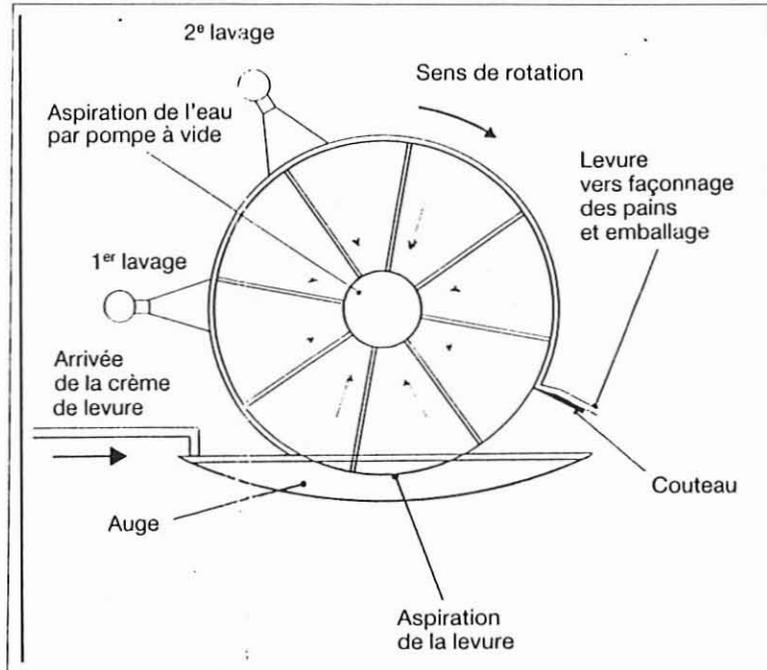


Fig. 28 Filtre rotatif deshydrateur (37, 8)

On ajoute du NaCl pour atteindre une concentration de 0,2 à 0,6 % (poids/volume) dans la crème de levure, provoquant ainsi une diminution de la taille des cellules par osmose (transfert de l'eau intracellulaire vers le liquide extra-cellulaire). La crème de levure est envoyée ainsi traitée dans une auge où baigne le filtre rotatif.

Durant la 1^{ère} phase de filtration, le liquide extra-cellulaire est en majeure partie éliminé. Dans un second temps, une fine pulvérisation d'eau pure est pratiquée sur le film de levure dans le but de chasser le liquide extra-cellulaire résiduel salé et assurer son remplacement par de l'eau pure. L'équilibre osmotique est alors inversé et la cellule réabsorbe le restant d'eau pure extra-cellulaire : la cellule commence à gonfler.

En agissant sur le taux de salage, il est possible de réguler la teneur en matières sèches (de 28 à 35 %) et la perméabilité de la levure (65).

Dès lors, on obtient une crème de levure à 22-23 % de M.S. voire un gâteau de levure à 32-33 % de M.S.. L'eau résiduelle, essentiellement intracellulaire, permet la survie des cellules (8).

Après mise en carton, la levure est conservée en chambre froide afin d'être réfrigérée à cœur avant expédition.

Les effluents sont ensuite gérés : le moût délevuré contient encore beaucoup d'azote organique non assimilé (bétaine) et de sels minéraux (sulfates). Les vinasses obtenues sont utilisées comme engrais ou dans l'alimentation du bétail après réduction de la teneur en potassium (37, 65).

Contrôles de la qualité sur les produits finis

Ces contrôles sont nombreux et ont lieu à chaque niveau de la chaîne.

- ◆ Couleur, odeur, consistance (rapport direct avec sa teneur en eau)
- ◆ Microbiologique : aspect des cellules, nombre de cellules en voie de bourgeonnement, quantité de cellules étrangères
- ◆ Force fermentaire : mesure de la quantité de CO₂ dégagée dans un temps donné.
- ◆ Composition biochimique : teneur en protéines, phosphore et sucres de réserve
La composition moyenne de 100 g de M.S. de levure est la suivante
 - Protéines : 45 g
 - Glucides (sucres totaux) : 43 g
 - Lipides : 6 g
 - Matières minérales : 6 g (8).

1.3. PASSAGE AUX DIFFERENTES FORMES COMMERCIALES

La levure existe sous 2 formes principales, bien qu'il en existe d'autres, mentionnées ci-après.

- ◆ La **levure fraîche** telle que la connaît l'artisan boulanger français : petit cube de couleur ivoire et d'odeur caractéristique, renfermant à lui seul 10 milliards de cellules vivantes de levure (et une très faible par d'autre micro-organismes) et contenant environ 70 % d'eau. Leurs parois déployées couvriraient une surface de 1 m²! (8, 65).
- ◆ La **levure sèche active**

1.3.1. Levure pressée

Celle-ci doit son nom au fait qu'elle était à l'origine obtenue sur filtre pressé. Dorénavant, la crème de levure est séchée sur filtres rotatifs continus sous vide.

Cette forme est à 32-33 % de matière sèche (une matière sèche élevée augmente la stabilité et la friabilité).

C'est la forme la plus répandue dans les pays industrialisés pour des raisons économiques et pratiques. Elle se présente sous forme de blocs compacts qui limitent le contact avec l'oxygène de l'air. De couleur blanche et très friable en France, elle peut être plus colorée et de consistance plastique dans d'autres pays. L'emballage « papier paraffiné » ou « papier sulfurisé et cellophane », en limitant les échanges gazeux et la migration de l'humidité, assure une meilleure conservation.

La levure pressée supporte très bien une congélation lente : elle conserve ses performances même après 1 an de stockage à - 18°C à condition que sa remise en œuvre passe par une décongélation en froid positif et qu'elle soit utilisée dans les 24 h.

Un contact trop prolongé avec le sel est plutôt à éviter même si, contrairement aux idées reçues, il n'est pas réellement dommageable (37, 23).

1.3.2. Levure émiettée

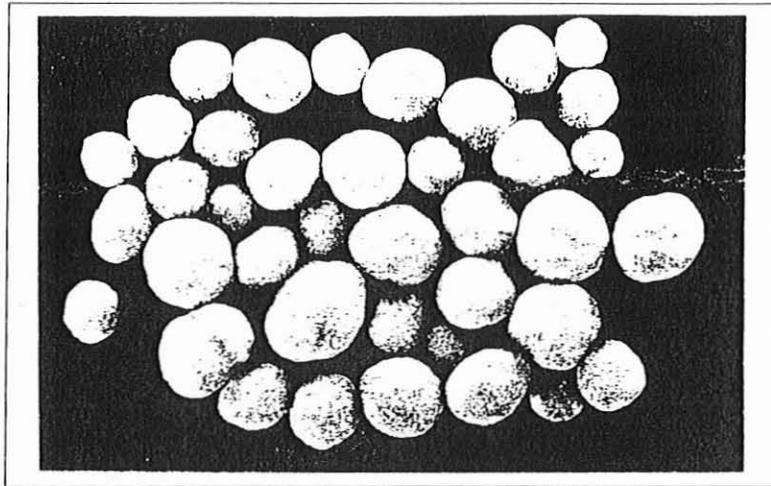
Elle se présente sous forme de particules relativement fines d'écoulement facile. En raison de sa très grande surface de contact, elle est très sensible à l'oxygène de l'air. C'est pourquoi on la conditionne en sacs étanches. Un sac ouvert est à utiliser dans la journée car l'échauffement dû à la respiration reprend de manière très active et rapide. Elle est souvent utilisée par les industriels pour une remise en suspension dans l'eau.

1.3.3. Levure sèche

C'est pendant la seconde guerre mondiale qu'aux U.S.A. a été développé un produit à 92 % de M.S. sous forme de granulés à réhydrater, présentant la stabilité recherchée, pour répondre à la difficulté de transport sur de longues distances ou de conservation dans des conditions inadaptées, de la levure pressée (8).

Leurs performances en panification sont limitées car elles ont peu de protéines, des membranes cellulaires endommagées et beaucoup de cellules sont tuées pendant le séchage.

♦ La levure sèche active, L.S.A. (37) Photo.7

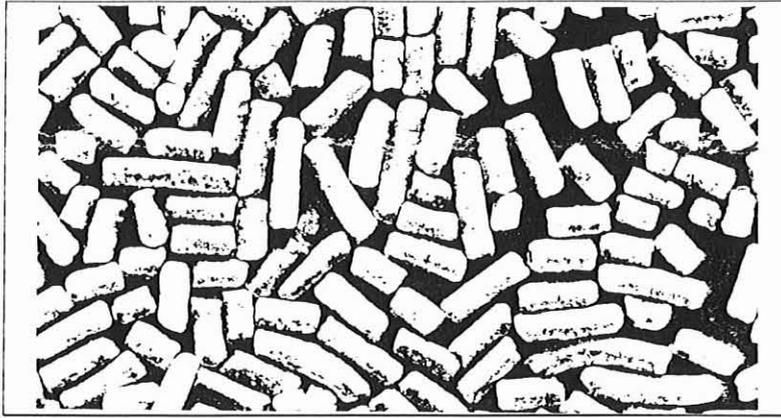


Sous forme de granules ou sphérules, le taux de cellules revivifiables est de l'ordre de 50 %. La rusticité du produit lui confère une bonne stabilité qui le fait apprécier dans les régions du globe où les conditions climatiques sont défavorables (température et humidité élevées). La remise en œuvre de la levure passe par une phase de réhydratation dans environ 5 fois son poids d'eau, entre 35 et 42°C (optimum : 38°C). La température conditionne le bon fonctionnement des mécanismes enzymatiques qui permettent aux cellules de retrouver leur imperméabilité. Une température trop basse (<5°C) ne permet aux cellules de retrouver ces propriétés assez rapidement : elles se vident de leur contenu et meurent.

La réhydratation dure environ 15 minutes, pendant lesquelles il ne faut pas tenter une dispersion mécanique de la levure au risque de l'endommager. Après ce temps de repos, elle se mettra très facilement en suspension pour former une crème.

Compte tenu de sa matière sèche et de son pouvoir fermentatif, 1 kg de levure sèche à réhydrater équivaut à 2 à 2,5 kg de levure pressée française de qualité « normale » (37).

♦ **Levure sèche instantanée, L.S.I. (37) Photo.8**



Apparue dans les années 1970, la levure sèche instantanée doit son nom au fait qu'il n'est pas nécessaire de la réhydrater avant son incorporation à la farine. Elle s'utilise aussi facilement que la levure pressée. Sa répartition est rapide et homogène mais l'utilisation de pétrins à très haute vitesse peut poser des problèmes de dispersion. Cependant, il faut lui éviter tout contact avec l'eau froide, glace ou paroi de pétrin réfrigérée sous peine que les cellules ne retrouvent pas la totalité de leurs propriétés biologiques. Leur sensibilité au froid est cependant inférieure à la levure sèche à réhydrater.

Le produit fini comporte 92 à 95 % de M.S. qui suffisent à maintenir la cellule en vie ralentie (23). On ajoute généralement des émulsifiants à la crème de levure ou au gâteau pour favoriser la réhydratation, donc améliorer son pouvoir fermentaire.

Elle se présente sous forme de vermicelles; elle est emballée sous vide après balayage à l'azote pour empêcher le redémarrage du métabolisme, en sachets durs permettant la stabilité du produit à température ambiante. Ce produit est à conserver bien à l'abri de l'air et de l'humidité.

1 kg de levure sèche instantanée équivaut à 3 kg de levure pressée (car elle renferme 2 kg d'eau, d'où une matière sèche différente).

La levure sèche reste pourtant un produit non compétitif vis à vis de la levure pressée en raison des surcoûts énergétiques liés au séchage et à la technologie d'emballage. Ce type de levure convient pour les produits destinés à la congélation.

A matière sèche plus basse (environ 75 %), les membranes des levures sont préservées; elle peut ainsi être congelée de longues années et être exportée vers des destinations lointaines où il n'existe pas de levure, ou pour des applications où la levure sèche active ne convient pas (37).

1.3.4. Levures sèches à pouvoir réducteur

La richesse en glutathion de la levure est exploitée pour ses effets relaxants sur la pâte. La culture est conduite de telle manière que sa synthèse soit importante. Les traitements thermiques imposés à ces souches doivent être bien maîtrisés pour éviter sa dénaturation (37).

1.3.5. Crème de levure (37)

Jusqu'en 1825, date à laquelle Tebbenhof introduit la levure pressée, la levure était commercialisée à l'état liquide. Le retour à cette forme correspond à une demande de la boulangerie industrielle.

+	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Dosage automatisé ◆ Pas de manutention ou de matériaux d'emballage à éliminer ◆ Dispersion homogène dans la pâte en pétrissage haute vitesse ◆ Standardisation de l'activité : le producteur règle le pouvoir ferment sur la base d'un taux de remplacement (1,5 l de crème pour 1 kg de levure pressée) ◆ La stabilité est sensiblement meilleure que les autres formes car elle ne comporte pas de sel résiduel.
-	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Coût, installation (2 cuves pour permettre le nettoyage 1 fois par semaine) ◆ Rentable pour une consommation de levure > 1 000 tonnes / an ◆ Coût de l'acheminement : on transporte 80 % d'eau ◆ Risques bactériologiques

Tab.27 : Avantages et inconvénients de la crème de levure (37)

1.4. CONSERVATION

Forme commerciale	Conservation
Levure pressée <ul style="list-style-type: none"> • Levure française normale • Levure haute activité 	10°C à cœur – 1 mois 4°C à cœur – 17 jours
Levure émietée	4 à 6°C – plus de 1 mois
L.S.A., L.S.I.	Température ambiante – plus de 1 mois
Crème de levure	< 4°C

Tab. 28 : Durées de conservation des différentes formes (8, 37, 23)

L'emballage hermétique n'est pas une condition suffisante pour la bonne conservation. La température joue un rôle majeur, d'où l'importance du respect de la chaîne du froid. Un produit à matière sèche élevée nécessite moins de précautions vis à vis de la température mais il doit impérativement être conservé à l'abri de l'humidité (8, 37, 23)

1.5. EMPLOIS

Globalement, l'emploi de **levure pressée** est réservé au domaine de la **panification**. Nous consacrerons tout un chapitre à ce thème.

Les **levures sèches instantanées** sont, quant à elles, essentiellement employées en **œnologie** et **panification**. Leur avantage principal est de ne pas nécessiter de réhydratation préalable.

Enfin, les **levures sèches actives** sont surtout utilisées en œnologie mais également chez les **brasseurs amateurs**, et plus rarement en panification.

Le marché mondial actuel de levures œnologiques est estimé à 500-600 tonnes, réparties sur 50-60 souches (en 1992) (21, 23).

Parmi les plus importantes firmes de L.S.A. de vinification se trouvent la firme Lallemand avec des unités de production au Canada et au Danemark, Gist Brocades aux Pays Bas, Universal Foods aux Etats Unis.

D'autres levuriers, en France, en produisent aussi, ainsi qu'en Allemagne, Chili, Italie, Afrique du Sud. Cependant, les quantités produites sont relativement faibles.

La technologie de production des L.S.A. de vinification se base sur celle mise au point pour les levures de boulangerie à part quelques paramètres de fermentation, les rendements en biomasse et le séchage.

Ainsi, pour produire une levure résistante au séchage (92 à 94 % de M.S.) , il faut qu'elle soit riche en glycogène et tréhalose, pauvre en azote et en phosphore. Pour ce faire, l'alimentation azotée est stoppée avant la fin de l'alimentation en sucre. La carence en azote provoque un appauvrissement des cellules en azote et un contrôle étroit de la concentration en phosphore (21).

Les L.S.A. de vinification sont conditionnées sous vide ou sous gaz inerte. Dans le cas de CO₂, le gaz est injecté directement dans l'emballage, juste avant la fermeture hermétique. Il est ensuite adsorbé par la levure ce qui permet de créer un vide d'air non négligeable (21).

Pour certains auteurs, la température de réhydratation est importante. De nombreuses études ont été faites à ce sujet. D'autres études ont montré qu'il est préférable d'utiliser un milieu sucré (eau sucrée ou moût coupé avec de l'eau), afin de réduire le choc osmotique (21).

2. LE PAIN

2.1. HISTORIQUE (64)

L'histoire du pain commence en 2800 avant Jésus-Christ à Babylone puis en Egypte, pays dans lequel 1800 ans avant notre ère, on cuit des pâtes de farine de blé allégées par la fermentation. Les Hébreux prennent le goût du pain auprès des Egyptiens, puis les religions judéo-chrétiennes diffusent ce produit (46).

La fabrication du pain, depuis la plus Haute Antiquité, est voisine de celle de la bière. D'abord galette plate non fermentée réalisée avec une bouillie de grains grossièrement broyés et vraisemblablement cuite sur des pierres plates chaudes, le pain constitue la base de l'alimentation depuis sept à huit mille ans. Les Egyptiens utilisaient probablement de la vieille pâte dans laquelle s'étaient multipliées des levures sauvages et des ferments lactiques.

D'autres procédés se sont développés depuis : la levure pour la boulangerie néerlandaise provenait d'un sous produit libéré lors du brassage de la bière et plus tard également lors de la distillerie du blé.

Lorsqu'on s'aperçut que la bouillie réalisée la veille produisait des bulles d'air, augmentait de volume et que, réincorporée avec de la nouvelle farine donnait un pain plus léger et de meilleur goût... le **pain au levain** était né.

Rapidement, les boulangers ont cherché à augmenter de manière empirique la population de levure pour que la vitesse de développement de la pâte soit plus rapide. Les Gaulois, d'après Pline, réalisaient leur pain avec de la mousse de bière (« cervoise ») mais il faut attendre le XVII^{ème} pour trouver trace de cet usage.

Jusqu'au **XVII^{ème} siècle**, le pain français est toujours confectionné à partir de levain de pâtes spontanément fermentées par la microflore des farines ou celle des macérations végétales (betterave, raisins, houblon, feuilles diverses...)

Dans un premier temps, on a utilisé de la levure de bière **jusque vers 1800**. Sa qualité était inconstante et elle se conservait mal. C'est de manière empirique que les levures de brasserie ou de distillerie ont été employées, les boulangers ne sachant pas qu'il s'agissait du même micro-organisme présent dans la farine.

Lorsqu' au **XIX^{ème}** les brasseurs optèrent pour l'utilisation de levures de fermentation basse, en lieu et place de la levure de fermentation haute, celle-ci ne convint plus du tout à la fabrication du pain. La levure de distillerie obtenue à partir de grains selon la méthode hollandaise suppléa la carence.

En **1825**, le levurier allemand Tebbenhof, qui travaillait selon la méthode hollandaise, fabriqua la première **levure pressée** (sous sa forme actuelle) alors qu'avant, la levure était vendue sous forme de crème.

Le premier procédé industriel de **fabrication de levure de boulangerie** est apparu vers **1850** à Vienne. Il suivait la technique de la fermentation haute au cours de laquelle on isolait la levure en recueillant de la mousse. Pour 100 kg de blé, on obtenait 9 à 14 kg de levure pressée. Un des problèmes posés était le rendement irrégulier, probablement en raison d'infections microbiennes. Il est évident qu'à cette époque, la levure était une substance coûteuse et rare.

Le mérite de PASTEUR a été de comprendre très tôt (1876) l'importance de l'aération dans la production de levure qui favorise la « génération spontanée ». Il a fallu attendre plus de 20 ans pour que cette constatation ait un impact commercial. En 1885, les techniques d'aération permettent de doubler la production, en passant à 30 kg de levure pressée pour 100 kg de grains.

Au cours du **siècle suivant**, le remplacement de la pâte de blé par de la mélasse et l'addition graduelle de mélasse à la masse en fermentation (méthode « **zéro** », inventée par Soren Sak, un Danois vers 1920) permettant une production d'alcool minimale, ont permis de considérablement accroître les rendements (9, 37, 60).

Vers 1914, la technique de **fabrication en direct** (uniquement à la levure), associée au pétrissage mécanique, supplante les méthodes traditionnelles de panification sur levain. Aujourd'hui, le pain est presque exclusivement fabriqué en direct : depuis 1950, la réduction de la durée de travail a entraîné une hausse des doses de levure conduisant à des pains très blancs, suroxydés, gonflés et aux goûts moins prononcés. L'emploi d'additifs (farines de fèves, acide ascorbique) et de conservateurs (acide propionique) aboutit à des pains de caractères organoleptiques uniformes et bien différents des pains d'autrefois (46, 65).

2.2. DEFINITIONS

La levure de boulangerie est caractérisée par le fait qu'elle est composée de cellules vivantes de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* : 1g de levure fraîche contient environ 10^{10} cellules (38).

Le « **pain traditionnel** » correspond au produit résultant de la cuisson dans un four d'une pâte pétrie et composée uniquement de farines panifiables (froment, seigle), en mélange ou non, d'eau potable et de sel de cuisine. Cette pâte est fermentée par des agents de fermentation autorisés, employés simultanément ou non : levure de panification, levain. On ajoute éventuellement des additifs ou adjuvants dont l'emploi est limité et autorisé (46, 8).

On appelle « **levain** » une pâte composée uniquement de farine, eau potable, sel et éventuellement de 0,2 % maximum de levure de panification (le reste étant composé des levures, bactéries acétiques et lactiques naturellement présentes dans la farine).

Cette pâte subit une fermentation naturelle, éventuellement initiée à l'aide de produits alimentaires réglementés par les usages et/ou par un ensemencement de micro-organismes autorisés par arrêté : une microflore est sélectionnée, comprenant bactéries lactiques et acétiques (acidifiantes) et levures spécifiques du levain (37, 46).

De tout temps, on a compris l'intérêt d'ajouter, à côté des levures présentes dans la pâte, un complément de levure, d'abord sous forme de levure de bière, puis sous forme de levure de panification (8).

La mention « sur levain » s'applique à un pain dont le seul agent de fermentation est un levain qui n'a pas été ensemencé en levure de boulangerie (46).

Poudres levantes

Improprement appelées « levure chimique », ces préparations sont interdites en panification. Constituées de sels minéraux et de bicarbonates, elle réagissent chimiquement en présence d'eau et produisent du CO₂ au cours de la cuisson. Elles n'ont aucune valeur nutritive (11, 74).

2.3. CONSOMMATION *Voir figures 29, 30*

On fabrique en France 6 milliards de baguettes et 2,5 milliards de pains par an en 1990.

Le pain français a une réputation mondiale tout à fait justifiée. La consommation est très variable selon les pays et a chuté : elle est passée de 200 kg/an/personne en France en 1820, à 58 kg/an/personne en 1996, soit environ 160 g/habitant/jour (28, 4).

Selon les spécialistes, une ration équilibrée correspondant au mode de vie actuel serait de 300-350 g pour les hommes (650 – 750 kcal), et de 200 – 250 g pour les femmes (430-530 kcal) (à majorer chez le sportif) (8).

En outre, on remarquera que plus la classe sociale est élevée, moins la consommation est importante (28).

2.4. PRODUCTION *Voir figure 31*

La fabrication française de pain avoisine les 3,5 millions de tonnes par an. Elle reste pour une très large part (72 %) artisanale (28).

2.5. INGREDIENTS DE LA FABRICATION DU PAIN

Farine

Elle provient de l'amande de blé séparée des enveloppes qui constituent le son. L'amidon est contenu dans des granules dont une faible partie est endommagée au cours du broyage, par là même nécessaire puisqu'il libère le substrat des amylases (8).

Fig. 29 : Consommation de pain en 1996 (28)

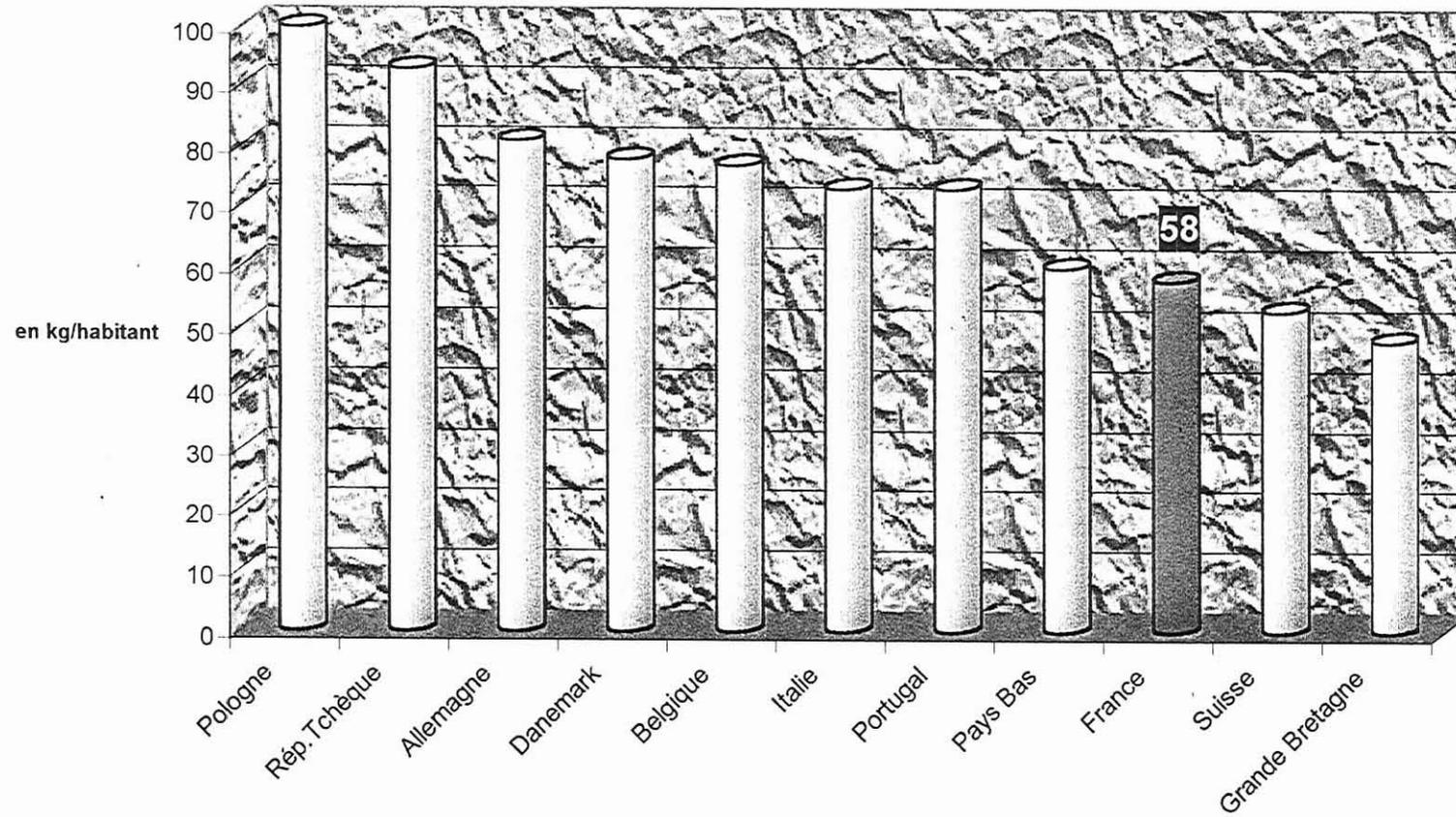


Fig. 30 : Consommation de pain par classe sociale en 1996 (28)

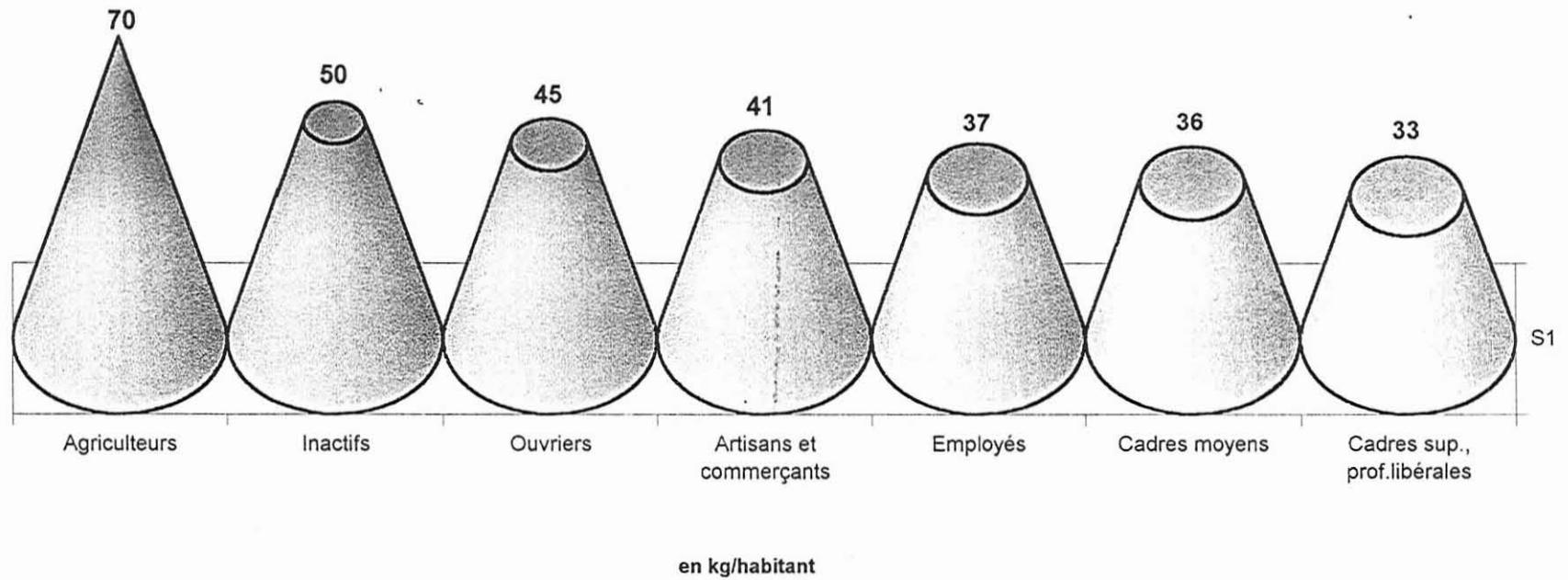
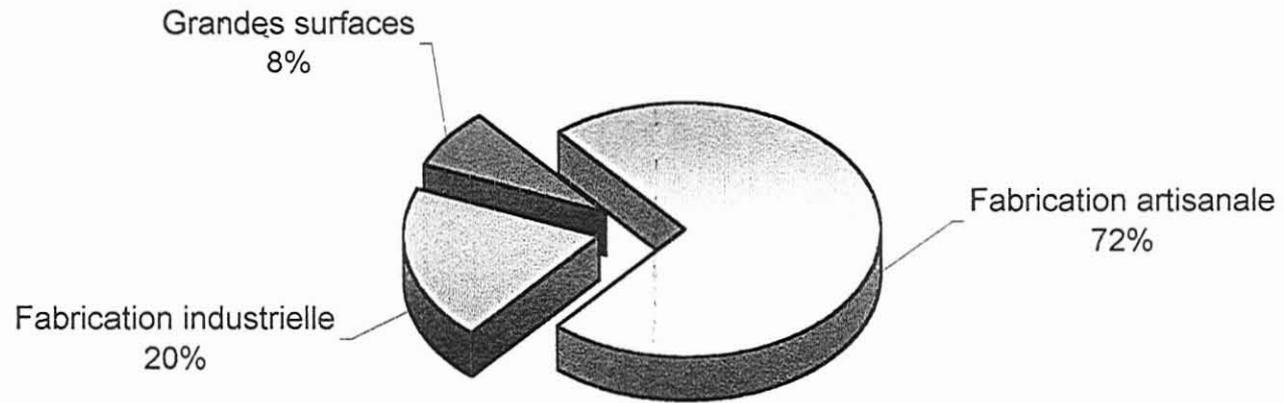


Fig. 31 : Répartition de la production de pain (28)



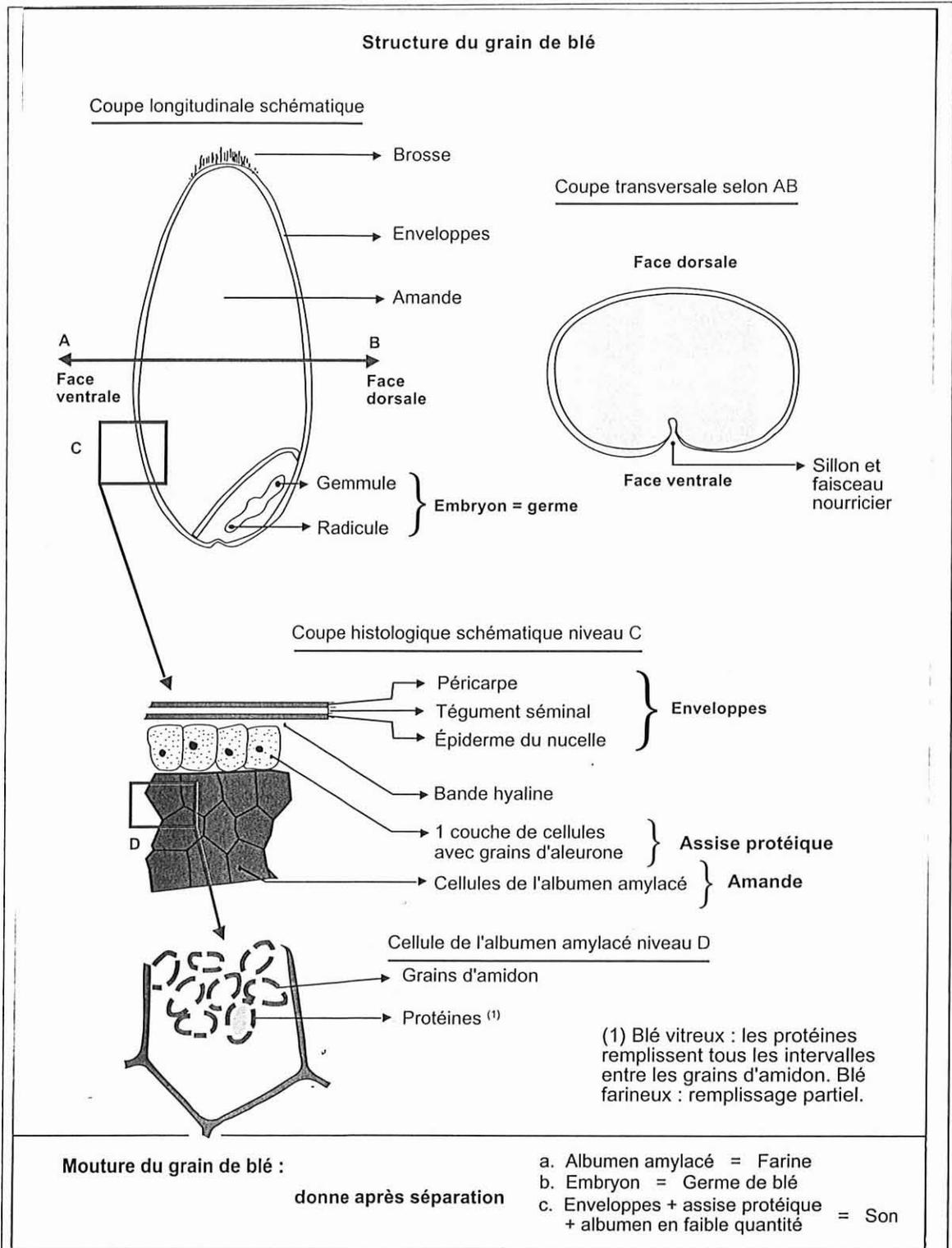


Fig. 32 : **Structure du grain de blé** (8)

La farine, en dehors du fait qu'elle est à la base de la fabrication du pain, est aussi un milieu de culture pour les levures. Etudions sa composition :

Amidon	68-72	Sodium	3 mg/100g
Eau	14-16	Potassium	135 mg/100g
Gluten (protéines)	8-12	Magnésium	20 mg/100g
Glucides	1-2	Calcium	16 mg/100g
Lipides totaux	1,5	Vitamine B1	0,1 mg/100g
Lipides complexes	0,6	Vitamine B2	0,8 mg/100g
Cendres	0,5-1,5	Vitamine PP	0,6 mg/100g
Glycérides	0,8		
Acides gras libres	0,2		
Acide linoléique	0,112		
Acides aminés libres	0,1		
Acide oléique	0,04		
Acide palmitique	0,038		
Acide linoléique	0,006		

Tab 29 : **Composition et propriétés de la farine de blé type 55 en pourcentage de M.S.** (46, 9).

Elle contient glucose, fructose, saccharose et levosine, sucres directement fermentescibles qui représentent 10 g/kg de pâte, de quoi produire environ 2 litres de CO₂ par fermentation alcoolique. Cette quantité de gaz n'est pas suffisante pour obtenir un pain bien aéré. Heureusement, la farine contient des α et β amylases qui permettent la libération de 15 à 25 g de sucres fermentescibles (maltose)/ kg de pâte dès le début du pétrissage. La quantité totale de CO₂ dégagée est donc de 5-6 l/kg de farine permettant une levée suffisante, malgré les pertes dues à la porosité et à la solubilisation de CO₂ dans l'eau de la pâte.

Il est donc capital que la farine soit suffisamment pourvue en amylases.

Pétrée avec de l'eau, elle doit être assez souple et étanche pour retenir les gaz formés (9).

Parmi les nombreux oligosides présents, le saccharose est le diholoside quantitativement le plus important (0,24% de M.S.) alors que le maltose ne représente que 0,07 % de la matière sèche du grain.

Rappelons que l'amidon est un polymère d'unités glucoses unies de manière linéaire en liaisons α_{1-4} (amylose) et de liaisons ramifiées α_{1-6} (amylopectine) (46).

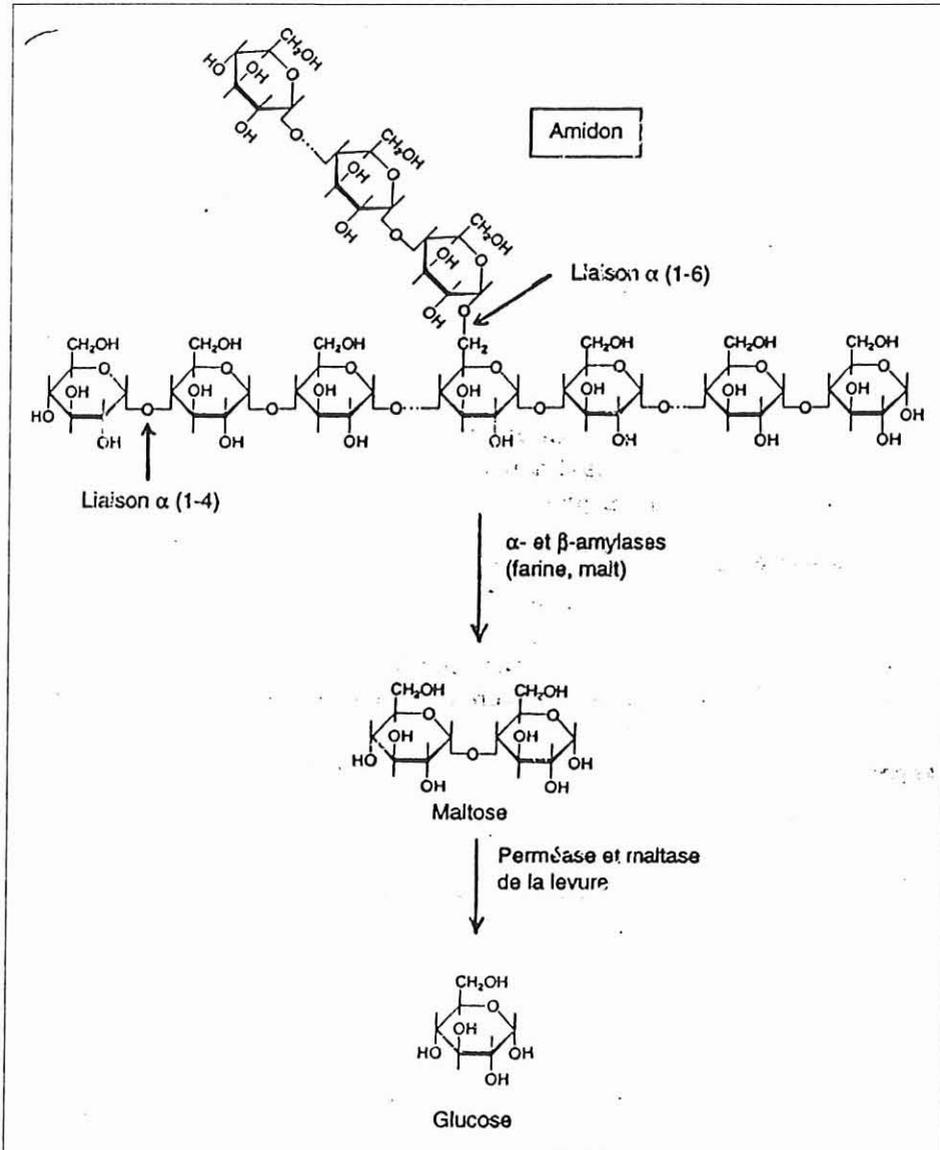


Fig.33 : Dégradation de l'amidon (41)

Eau

Elle doit être potable et suffisamment dure (riche en sels de calcium) pour renforcer le gluten. Une eau trop douce conduit à des pâtes gluantes (8).

Sel

Il intervient dans la saveur, les qualités mécaniques de la pâte, la coloration, la conservation (8).

Additifs autorisés (8, 46)

5 additifs sont autorisés en panification de froment :

- ◆ Acide ascorbique (E300) : il réduit la durée de panification, accélère la maturation, renforce les propriétés physiques de la pâte.

- ◆ Amylases (blé, malt, fongiques) : indispensables, pour corriger le manque d'activité amylasique des farines.
- ◆ Lécithine de soja (E322) : émulsifiante, elle favorise l'extensibilité de la pâte, en facilite le travail mécanique et améliore la conservation du pain.
- ◆ Farine de fève : son utilisation pose un problème lors du pétrissage intensifié car la lipo-oxygénase qu'elle comporte forme des peroxydes, responsables de l'altération du goût du pain. Cette enzyme provoque un blanchiment de la pâte du fait de l'oxygénation des pigments caroténoïdes.
Elle renforce la résistance du gluten.
- ◆ Acide citrique : améliore la saveur du pain de seigle.

2.6. SCHEMAS DE FABRICATION DU PAIN (46, 73, 64).

2.6.1. Mécanisme de la panification Voir figure 34

Deux fermentations à 25°C, de durée variable se succèdent. En général, quand le temps de pointage est long, le temps d'apprêt est réduit, et vice versa.

Type de pétrissage	Quantité de levure nécessaire	Type de pâte obtenue
Pétrissage lent	1 à 1,5% de levure/poids de farine	Pâte douce
Pétrissage amélioré	1,5 à 2%	Pâte batarde
Pétrissage rapide	2 à 2,5%	Pâte ferme

Tab. 30 : Quantité de levure à ajouter selon le pétrissage pratiqué

En panification Française, il est classique d'ajouter 2,5 kg de levure pressée par quintal (100 kg) de farine ou pour 60 l d'eau de coulage (soit 42 g/l). Ces doses dépendent néanmoins du diagramme de panification et de la température du fournil (8, 14, 23).

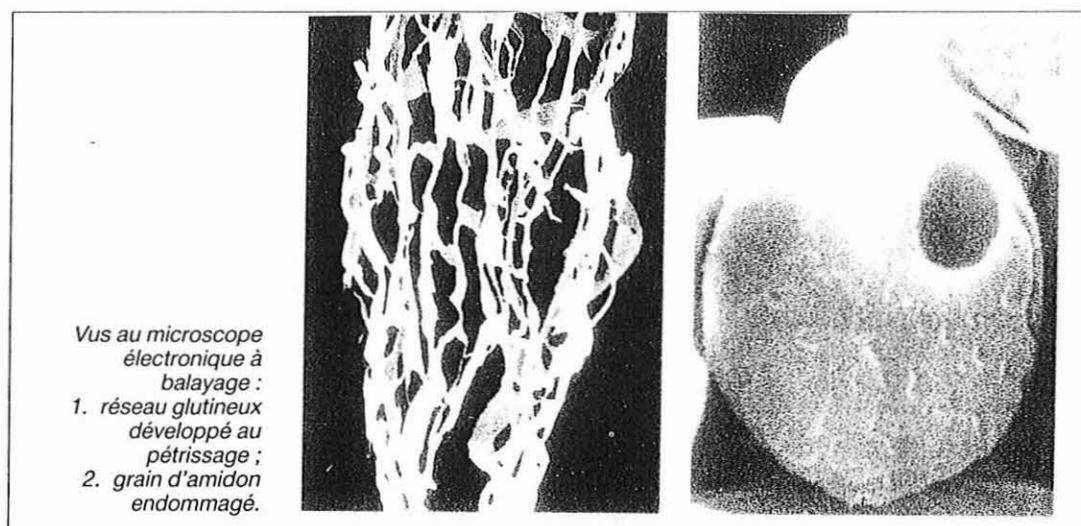


Photo.9 : Réseau de gluten (G), grain d'amidon (D) (8)

Fig.34

FABRICATION DU PAIN (46, 62)

PETRISSAGE
Farine + eau + sel + levure

Le gluten devient ferme, élastique et moins extensible.



FERMENTATION PRINCIPALE
= POINTAGE = PRISE DE FORCE

La levure utilise les sucres directement fermentescibles (glucose, fructose) en 20 minutes, ainsi que le saccharose qu'elle a hydrolysé avec son invertase.

Seul 1/3 du CO₂ nécessaire à la levée est produit.

Le maltose et le fructose ne peuvent être utilisés tant qu'il persiste une concentration suffisante de glucose.

L'utilisation des produits de dégradation de l'amidon (maltose, dextrines) ultérieure fournira le reste du CO₂ mais à ce stade, c'est l'éthanol qui joue le plus grand rôle car CO₂ se redissout dans l'eau.



DIVISION, PESEE, FACONNAGE DES PATONS



FERMENTATION SECONDAIRE
= APPRET

L'amidon est dégradé en sucres simples. Ici, la libération de CO₂ a plus d'importance que la production d'éthanol car le gaz remplit les alvéoles du réseau de gluten formé au pétrissage.



CUISSON

CO₂ subit une expansion, l'éthanol s'évapore, d'où l'importance des grignes.

Jusqu'à 55°C, la fermentation est accélérée.

Toutes les levures sont tuées à 55°C.



RESSUAGE

Refroidissement

Equilibration de l'humidité par une bonne conservation

2.6.2. Procédés de fabrication du Pain Français (9, 46, 64)

Jusqu'en 1840, la levure était employée mélangée au levain, selon le procédé dit « sur français ». Puis un boulanger autrichien introduisit en France l'utilisation de la levure seule. Le pain viennois obtint beaucoup de succès, mais cette panification, dite « sur poolish », restait limitée aux pains de luxe car elle nécessitait une préparation longue et fastidieuse. Plus tard, le travail « direct », évoqué ci-après, remplace le travail sur « poolish » (8).

- Méthode directe

La technique aujourd'hui employée est la **méthode directe**, ou panification sans levain : la pâte finale est directementensemencée massivement à la **levure pressée** (2 à 4% par rapport au poids final de farine utilisée).

La fermentation est rapide, et le pointage très court voire inexistant. Cette pratique est la plus utilisée car elle permet de réduire la quantité d'énergie nécessaire à la fabrication, d'accroître le volume du pain et le blanchiment de la mie. Alors que les qualités physiques du pain évoluent rapidement, le produit fini n'a que peu de goût, étant donné que la fermentation n'a pas été assez longue pour que les arômes puissent se développer.

Les souches de **levure pressée** utilisées en France et en Europe sont du type « **adaptation rapide au maltose** ». Cette catégorie s'est développée dans les années 1960 pour répondre à l'apparition des méthodes de panification directes, dans les panifications sans sucre ajouté. En raison de leur mauvais comportement sur les pâtes très sucrées (> 15 % de saccharose/farine), des souches osmotolérantes ont été proposées vers 1980. La difficulté des boulangeries à gérer plusieurs qualités de levures accélère le développement de souches à large spectre d'application dans les années 1990.

Riches en azote donc en protéines, elles augmentent la vitesse des fermentations. Leurs inconvénients majeurs sont d'être instables (car elles ont une activité enzymatique importante) et pauvres en sucres de réserve. La forte teneur en protéine leur imposant une matière sèche basse afin de garder une cohésion acceptable, elles nécessitent le maintien d'une chaîne du froid très rigoureuse. Une élévation de la température accélérera la consommation du glycogène puis du tréhalose. Quand ces glucides seront épuisés, la levure attaquera ses propres protéines. Cette autolyse sera responsable de la dégradation de son activité et de son aspect physique (27, 45).

2.6.3. Technique au levain naturel (9, 46, 64)

- Flore naturelle des céréales

- ◆ *Saccharomyces* : Cette espèce est en majeure partie représentée par *S.cerevisiae* (80% des *Saccharomyces* présents) et *S.exiguus*, mais il existe aussi *S.ellipsoïdus*, *S.turbidans*, *S.uvarum*.
- ◆ *Candida krusei*, *C.tropicalis*
- ◆ *Torulopsis holmii* est proche de *Candida*, certains taxonomistes les assimilent. D'ailleurs, *Candida holmii* et *Torulopsis holmii* sont la forme imparfaite de *S.exiguus*.
- ◆ *Pichia saitoi*

◆ *Hansenula anomala*

Ainsi, la levure de boulangerie produite sur mélasse par les levuriers est de la même espèce que la levure la plus fréquente de la flore naturelle des farines.

La population des levains peut varier selon le pays mais retrouve globalement les mêmes espèces.

Certaines souches des levains naturels sont des levures acido-tolérantes, aspect très intéressant car le pH de la pâte peut atteindre 3,8, pH auquel *S.cerevisiae* se développe très mal. Ceci explique pourquoi certains pains réalisés sur levain traditionnel peuvent également présenter des développements importants (9, 46, 37, 65, 45).

D'autres groupes de levure peuvent être utilisés pour des applications boulangères très spécialisées (37).

APPLICATIONS	GÉNRES	ESPÈCES
Multiusage	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Pâtes très sucrées	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. rosei</i>
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. rouxii</i>
Renforcement flaveur	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. delbrukii</i>
	<i>Candida</i>	<i>C. lusitaniae</i>
Starters levains	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. exiguus</i>
	<i>Torulopsis</i>	<i>T. holmii</i>
	<i>Candida</i>	<i>C. milleri</i>

Tab. 31 : Levures pour applications boulangères différentes (37)

• Composition de la flore des levains

On appelle « flore de levain » la population de micro-organismes que l'on peut rencontrer dans une farine que l'on aurait laissée fermenter sans autre adjonction de micro-organismes et après l'avoir placée dans de bonnes conditions (apport d'eau, 20-25°C).

La connaissance de la flore des levains est très difficile. La quantité de micro-organismes présents peut varier d'un facteur de 1 à 20.

Lorsque l'on panifie sur levain, on a au mieux 1 g de levure par kilogramme de farine, ce qui explique la lenteur de la levée par rapport à une pâte enrichie en levures (9, 46).

• Technique sur levain

La fermentation est assurée par un morceau de pâte renfermant une population sauvage de levures et bactéries acidifiantes. Mais le levain est souvent utilisé comme additif à une fermentation classique sous forme « levain-levure ».

La législation française de 1996 interdit l'adjonction volontaire de levure dans un pain sur levain.

La fabrication du levain doit se faire en plusieurs étapes (3 maximum), chacune d'elle correspondant à la confection d'un nouveau levain à partir d'une pâte (farine, eau et parfois du sucre) à laquelle on ajoute la totalité ou une partie du levain réalisé à l'étape précédente.

Levain 1 : farine + eau => pétrissage => repos 12 à 24 h
Levain 2 : farine + eau + levain 1 => pétrissage => repos 12 à 24 h
Levain 3 : farine + eau + levain 2 => pétrissage => repos 12 à 24 h

Citons la description de Malouin en 1771 de la préparation du levain :

Le boulanger prélève un morceau de pâte sur l'une des fournées du jour : ce n'est autre que le « levain chef ». Son poids est doublé par adjonction de farine et d'eau puis pétrissage et fermentation : il obtient le « levain de 1^{ère} ». Une seconde manipulation de ce type mène au « levain de 2^{nde} ». Après une dernière fermentation, le « levain tout point » servant à ensemer la pâte est prêt (8).

A chaque étape correspond un enrichissement de la flore naturelle. Le levain est prêt quand la pâte lève spontanément, c'est à dire quand la quantité de levure sélectionnée par fermentation naturelle est suffisante pour faire lever le pain.

L'apparition de la levure a modifié ce type de fermentation très ancien. Sa préparation nécessite plusieurs mois d'essais !

C'est pourquoi cette technique est longue et exige beaucoup d'expérience. Une fois obtenu, il est nécessaire d'entretenir le levain de jour en jour pour ne pas le perdre.

La technique sur « un levain » est la plus couramment employée car la plus souple (46).

On aboutit à des pains très acides, dont la mie compacte s'imbibe difficilement d'eau, et de qualité organoleptique incomparable (8, 45, 56).

2.6.4. Diagramme intermédiaire : « levain/levure » (9, 46, 64)

C'est le diagramme le plus couramment employé pour les pains « au levain » d'aujourd'hui.

De très petites quantités de levure peuvent être ajoutées aux levains et/ou dans la pâte finale (0,2 à 0,5 % du poids de farine utilisée).

Les fabrications levain-levure d'aujourd'hui utilisent pour la plupart un seul levain qui fermente quelques heures, et qui peut avoir été prélevé sur la pâte de la fournée précédente (levain de pâte).

Une fraction de pâte estensemencée et fermente jusqu'à obtenir 3 fois son volume avant d'être incorporée au cours du pétrissage d'une fabrication suivante.

Cette méthode, très différente du travail au levain du fait de l'ensemencement en levure, permet de réduire l'intensité du pétrissage sans imposer une durée de pointage plus longue.

Ces diagrammes donnent des pains de goût agréables, légers, non acides et suffisamment riches en arômes.

Technique « viennoise », sur « polish »

C'est une technique identique à la technique levain/levure mais les levains réalisés sont sous forme de liquide pré-fermenté entre 2 et 20h à 25°C (50% eau + 50% farine) et non sous forme de pâte.

Ce procédé est lui aussi très couramment employé puisqu'il renforce le goût et la pâte, favorise l'alvéolage de la mie et augmente la conservation.

Cette technique, employée dans la fabrication des baguettes, utilise des micro-organismes et forme des arômes différents de ceux obtenus par fermentation en pâte (45).

2.6.5. Evolution des techniques de fabrication du pain

La fabrication du pain est devenue plus régulière et plus simple. On obtient des pains plus légers et plus beaux mais avec moins de goût car la fermentation est plus rapide. On utilise parfois des starters (bactéries) pour la réalisation de levains et assurer une fermentation suffisante aux côtés des levures mais ceci nécessite des fermentations longues pour l'obtention d'un levain satisfaisant (16 à 24h) (9).

Critères de sélection d'une culture starter

- ◆ souche hétérofermentaire (au moins en partie) = qualité de l'arôme et de la flaveur
- ◆ croissance rapide sur milieu de culture ainsi que dans le milieu farine + eau
- ◆ résistance à la déshydratation et/ou congélation
- ◆ métabolisme facilement réactivé après inoculation et réhydratation à basse température
- ◆ conservation améliorée par production d'antifongiques
- ◆ production d'arômes, de goût, élasticité de la mie, taille des pores...
- ◆ absence de production de toxines ou d'antibiotiques (9, 46).

Exemples de cultures starter

- ◆ levains de Krüger : espèces non précisées
- ◆ levain de Spiller : *Lactobacillus brevis* et *Saccharomyces dairensis*
- ◆ levain de Kline : forte concentration de bactéries lactiques et acétiques. Le problème de ce levain est l'incapacité de *Torulopsis holmii*, levure naturellement associée à *Lactobacillus San Francisco*, à résister à la lyophilisation. Cette levure est souvent remplacée dans le processus de panification par *Saccharomyces cerevisiae*.
- ◆ levain de Hardy : *Candida tropicalis* + *Lactobacillus plantarum* (46).

2.6.6. Cas du pain surgelé (9, 46, 64)

Le pain obtenu présente une mie grossière et rayonnée, une croûte sombre et un petit volume. Ceci est dû au fait que lorsque la pâte est congelée, CO₂ se dissout dans l'eau de la pâte. Comme la levure n'est elle-même pas capable de générer des alvéoles gazeuses, seul un faible nombre de cellules se développe après décongélation ; d'où l'importance de veiller à ce qu'une pâte se développe suffisamment avant la surgélation.

Cette dernière lui fait perdre lentement ses propriétés, d'où une durée de pousse plus longue après décongélation. C'est la raison pour laquelle les fabricants de levure ont introduit sur le marché des levures qui résistent à la surgélation, dont les propriétés restent actives beaucoup plus longtemps que celles de la levure pressée normale. Il n'y a de sens à utiliser cette levure résistante à la congélation qu'à condition que la pâte soit conservée plus de 14 j au surgélateur (60).

Dans ce type de préparation, il faut utiliser des levures cryorésistantes, ce qui existe déjà puisque des cellules de 3 250 ans (âge estimé) ont été retrouvées vivantes dans les glaciers de l'Antarctique. Des cycles de congélation/décongélation n'affectent que peu la production de CO₂. Pour une bonne conservation, il faut éviter la formation de glace extracellulaire donc être dans un milieu le moins hydraté possible, réduire au maximum le volume cellulaire et enfin favoriser la formation de composés cryoprotecteurs tels que le tréhalose (37).

2.7. ROLES DE LA LEVURE

2.7.1. La levée de la pâte

Les levures, en produisant la presque totalité du CO₂ nécessaire par fermentation rapide du glucose, sont les micro-organismes à l'origine de la levée de la pâte : elle peut atteindre jusqu'à 3 fois son volume initial (9, 4).

Pour le boulanger, il importe que pendant la fermentation, la pâte soit dépourvue d'oxygène pour que seule la fermentation ait lieu.

Contrairement aux idées reçues, l'alvéolage de la mie de pain ne correspond pas à la répartition des cellules de levure mais à la dilatation du CO₂ qu'elles produisent (37).

2.7.2. Développement des arômes et de la flaveur

Les levures contribuent également, mais très faiblement par rapport aux bactéries, à l'arôme du pain (9). Quelques 300 molécules issues de la fermentation secondaire interviennent mais seules 30 ont un rôle majeur (4).

Des chercheurs ont constaté que la pleine expression des substances aromatiques produites dépend de la durée de fermentation qui doit être au minimum de 3 heures. Le raccourcissement de cette durée, notamment en production industrielle, empêche une grande partie des composés aromatiques de se développer (6, 4).

2.8. PARAMETRES INFLUENCANT LA FERMENTATION de *Saccharomyces cerevisiae*

♦ **Température** : c'est sans doute le facteur le plus important. Globalement, une température de 22 à 25°C est suffisante en boulangerie.

Température	+ 4°C	10-15°C	25°C	26-28°C	30°C	45°C	55°C
Métabolisme de la levure	Bloqué	Très ralenti	2 fois moins rapide qu'à 35°C	Optimal	Risque de mort prématurée des cellules	Très ralenti	Mort des cellules

Tab. 32 : Evolution du métabolisme levurien selon la température

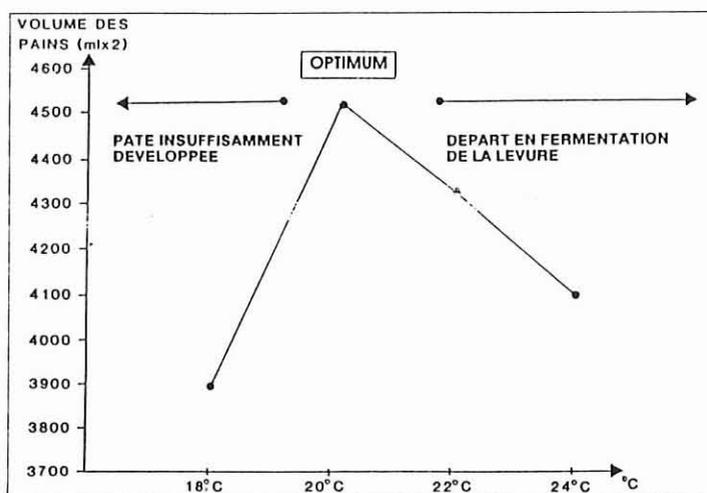


Fig. 35 : Influence de la température des pâtes sur le volume des pains (37)

- ◆ **pH** optimum : 4,5 à 5,0 mais le pH de 6,0 des pâtes sur farine de blé « ordinaire » juste après le pétrissage est tout à fait favorable
- ◆ Les vitesses maximales de dégagement du CO₂ sont d'environ 40 ml de CO₂/g de levure fraîche/h. Par contre, elle peut s'élever à 150-250 ml/g/h en aérobiose ou anaérobiose, dans le cas de cultures en milieu liquide sur glucose ou maltose. Les vitesses de production du CO₂ en anaérobiose chez la levure de boulangerie ne sont par conséquent pas utilisées au maximum.
- ◆ Le **sucré**, ajouté en faible concentration augmente l'activité de la levure alors qu'à plus fortes doses, avec des hydratations de pâtes plus faibles, il la ralentit, probablement à cause de l'accumulation d'alcool auquel elle est très sensible. En conséquence, lorsque la formule contient des proportions importantes de sucres et de lipides, il convient d'augmenter la dose de levure jusqu'à 5, voire 8 %, du poids de farine. On retient également de tels pourcentages pour des formules moins sucrées mais réalisées avec un schéma court. Pour la fabrication de biscottes, une formule classique apporte 5 % de glucides, 5 % de lipides et autant de levure par rapport au poids de la farine.
- ◆ Une proportion élevée de **sel** dans la pâte peut freiner sensiblement la fermentation.
- ◆ La fermentation peut être freinée par l'addition d'agents **anti-moisissures** (propionates) agissant comme inhibiteurs. Ces substances sont parfois ajoutées à la pâte pour améliorer la conservation des pains de mie pré-emballés. Il en est de même avec Cu²⁺ provenant d'anciennes tuyauteries, les ammoniums quaternaires des antiseptiques, Cl⁻ en excès dans l'eau de ville (9, 37, 8, 23).

2.9. CARACTERISTIQUES DES LEVURES DE BOULANGERIE

(64)

- ◆ Vitesse et rendement fermentaire élevés
- ◆ Obtenues sur mélasses
- ◆ Résistance au séchage pour celles destinées à être L.S.A.
- ◆ Résistance à la congélation pour la préparation de pâtes congelées
La levure perd peu à peu ses capacités à générer du CO₂, semble-t-il à cause de la toxicité de métabolites générés pendant la fermentation qui précède la congélation. Cette fermentation doit donc être réduite au maximum.
- ◆ Levures blanches : préférées aux levures plus foncées
- ◆ Bonne conservation
- ◆ Souches osmotolérantes. Elles :
 1. Accumulent du glycérol intracellulaire à haute concentration , permettant ainsi de contre-balancer la haute pression osmotique du milieu
 2. Contiennent beaucoup de tréhalose assurant la protection des membranes
 3. Ont une activité invertase faible : cette enzyme, que *Saccharomyces cerevisiae* possède, hydrolyse le saccharose du milieu, ce qui double la pression osmotique !
Les souches traditionnelles accusent une réduction des capacités fermentaires.
- ◆ Tolérance à l'acide propionique, inhibiteur de moisissures (pain de mie)
- ◆ Pouvoir aromatique
- ◆ Utilisation accélérée du maltose : il existe des mutants qui synthétisent la maltose perméase et la maltase malgré une concentration en glucose > 0,1 %
- ◆ Des hybrides résultant de *Saccharomyces cerevisiae* et *S.uvarum* dégradent les liaisons α entre le glucose et le galactose du mélibiose. L'invertase coupant la liaison fructose d'avec le glucose du mélibiose, le raffinose est entièrement hydrolysé (52, 41,23)

PARTIE II

Chapitre II

PRODUCTION DE BIOMASSE LEVURIENNE

MORTE

3. Levures-aliment,
Protéines d'Organismes Unicellulaires

3. LES LEVURES-ALIMENT

3.1. DEFINITION ET COMPOSITION

La définition de la levure aliment destinée à l'alimentation de l'homme établie par la CEE ne fait pas état de la teneur en acides aminés et vitamines. Elle est la suivante :

Humidité	4 à 5g pour 100g
Protéines (N x 6,25)	45 à 52g pour 100g
Lipides (55-75 % d'Agras insaturés)	5 à 9g pour 100g
Glucides (glycogène surtout)	27 à 36g pour 100g
Cendres	7 à 9g pour 100g
Germes totaux	50 000 par g
<i>E.coli</i>	Absence dans 0,1g
Salmonelles	Absence dans 25g
Staphylocoques	Absence dans 0,1g
Moisissures	< 100 /g

Tab.33 : Composition des levures-aliment (76)

100g de levures sèches contiennent autant de protéines que 250g de viande et autant de glucides que 65g de pain ; elles se distinguent par leur richesse en protéines et vitamines du groupe B (32).

❖ Protéines

L'apport en protéines des levures aliment dépasse 48 % (74) mais il varie selon l'espèce, la souche et le milieu. Ainsi, *Candida utilis* est plus riche en protéines (70 %) sur alcanes que sur mélasses (50 %) (58).

Elles ont une activité biologique comparable à celle des protéines d'origine animale, compte tenu de leur composition (76) :

- une faible teneur en **acides aminés soufrés (méthionine et cystéine)** : (52, 32, 30, 74, 58). Ce taux est inadapté aux besoins de l'adulte et de l'enfant (même s'il en nécessite moins) (16).
- mais elles sont bien pourvues en **lysine** (acide aminé important pendant la croissance, quasiment toujours déficitaire dans les protéines végétales, ce qui pose problème dans le quart-monde). Les levures aliment trouvent donc leur application dans la supplémentation des régimes à base de céréales, fruits ou graines oléagineux (52, 32, 30, 74, 58).

Les protéines de levures-aliment renferment les 8 acides aminés essentiels (pour les très jeunes enfants, l'histidine est également indispensable) (32).

La teneur en **acides nucléiques** (4 à 12 %) limite la consommation de levure par l'homme. Hormis la farine de foie, aucun aliment n'en contient une telle quantité. En effet, l'excédent des acides nucléiques de l'alimentation est transformé en acide urique. L'absorption régulière de levure ne devrait donc pas dépasser 30 g/j (32, 30).

Cette richesse en acides nucléiques permet néanmoins leur emploi comme exhausteurs de goût (52).

Chez les végétaliens, dont le régime est dépourvu de protéines animales, la consommation des 30 g/j de levures fournit 12 à 15 g de **protéines**, soit l'équivalent de 75g de viande. Une telle dose est couramment donnée aux dénutris alimentés par sonde.

La consommation de levure est également recommandée dans les régimes amaigrissants, chez les femmes enceintes ou allaitantes et les enfants, chez qui les besoins en lysine sont importants, ainsi qu'au sportifs et aux personnes âgées (74).

❖ Minéraux

Ils sont principalement sous forme de complexes organiques, pour lesquels la biodisponibilité est plus grande que sous forme inorganique, c'est à dire de sels minéraux (30, 74).

❖ Vitamines

Les levures constituent une source exceptionnelle abondante en vitamines hydrosolubles du groupe B (B₁, B₂, B₆) ainsi qu'en vitamine PP et acide panthoténique. Cependant, la vitamine B₁₂ est absente sauf dans la levure de bière et les levures lactiques qui en contiennent des traces (32).

Un apport quotidien de 5 g de levure met l'organisme à l'abri de subcarences vitaminiques, si fréquentes de nos jours (74).

Pour que l'organisme tire profit du potentiel vitaminique, il faut toujours utiliser des levures tuées. En effet, l'ingestion de cellules vivantes pourrait entraîner de véritables avitaminoses qui s'expliquent par le fait que les levures captent à leur profit certaines vitamines apportées par d'autres aliments. Ainsi, les levures de bière collectent la thiamine du malt sur lequel elles se développent, ce qui expliquerait leur richesse en vitamine B₁ par rapport aux levures poussant sur d'autres substrats (32).

Quelques unes contiennent d'autres groupes de vitamine. Les levures lactiques (*Kluyveromyces*) possèdent un taux intéressant en tocophérol (vitamine E) et surtout en acide ascorbique (vitamine C), parfois supérieur aux taux cumulés de toutes les vitamines du groupe B produites. La levure de bière est une bonne source d'ergostérol, précurseur de la vitamine D₂ (32, 58).

Les levures cultivées sur alcane sont plus pauvres en vitamine B₁ et plus riches en riboflavine et vitamine B₂ que la levure cultivée sur glucides. Elles apportent 30 à 60 % des besoins en vitamines de l'adulte, de l'enfant et de l'adolescent, sauf la vitamine B₁₂, absente dans les levures classiques, et peu présente dans les levures sur alcane (16).

Les minéraux et vitamines, en étant exclusivement sous forme combinée, font que la levure est fondamentalement différente d'un mélange artificiel minéral et vitaminique (30).

3.2. PRODUCTION

8 700 à 10 470 t/an de levures-aliment sont produites de 1978 à 1988, dont 40 % de levures lactiques. L'exportation était de 30% vers la CEE en 1988 (32).

La société Fould Springer, pionnière en matière de levures-aliment, est probablement encore toujours le principal producteur mondial, qu'elle exporte à plus de 90 % (65).

3.2.1. Choix de la souche

Pour éviter tout risque de pathogénicité, le choix des espèces utilisables en alimentation humaine s'est fait spontanément à partir de levures abondantes les produits alimentaires fermentés, en se basant aussi sur le principe qu'elle le métabolise rapidement (30).

Les levures proviennent de brasseries, distilleries ou de cultures directes sur substrats adaptés, en aérobiose forcée pour obtenir les cellules et non les produits du métabolisme (32, 30, 74).

3.2.2. Substrats

Le choix est fonction de son prix. Il doit en outre être exempt de toute substance pouvant se révéler toxique. L'utilisation d'effluents agricoles résout de nombreux problèmes. Les déchets agricoles et des industries du bois participent pour une grande part à la pollution des eaux. Les déchets amylicés, cellulosiques, les mélasses, le lactosérum, les liqueurs sulfiteuses sont les plus abondants. Leur point commun est une teneur assez élevée en sucre, surtout des hexoses (58).

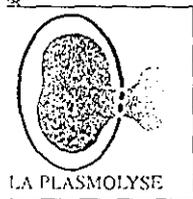
En général, la levure porte l'appellation du substrat sur lequel elle a été cultivée : levure de mélasse, levure lactique, levure de bière, levure de sucre de canne... La mention du milieu de culture doit figurer sur l'étiquette du produit fini (74).

- Le **lactosérum**, ou petit-lait, est le substrat le plus couramment utilisé. Il provient essentiellement de la fraction du lait lors de la précipitation ou floculation de la caséine, ou caillé. Il représente 50 % de la M.S. issue du lait. Longtemps rejeté car considéré sans intérêt et polluant des cours d'eau. Il possède toutefois une réelle valeur nutritive de par sa richesse en lactose (80 % de la M.S.). L'évolution des industries fromagères conduit à une production de plus en plus importante de lactosérum : elle correspond à 9 fois le tonnage des fromages fabriqués. On considère qu'il faut 10 litres de lait pour fabriquer 1kg de fromage type pâte pressée et 9 litres de lactosérum.

On y cultive des levures lactiques telles que *Kluyveromyces fragilis*, *K.lactis*, *K.marxianus*, mais aussi *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, et *Candida*. Les souches capables d'utiliser le lactose sont peu nombreuses.

En 1985, seule la société Bel valorise le lactosérum en utilisant *K.fragilis*. La levure Protibel obtenue a un taux protéique de 50 % est très riche en lysine (52, 36, 32, 58, 65, 30, 74, 39, 55).

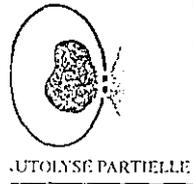
Photo 10 : Traitements appliqués à la crème de levure (11)



LA PLASMOLYSE

La crème de levure subit un bref choc thermique destiné à inactiver les systèmes enzymatiques des cellules et à créer des lésions dans leurs enveloppes. Ce traitement permet de libérer des composants hydrosolubles et rend assimilables par l'homme et l'animal les protéines intracellulaires restantes.

La crème de levure ainsi "plasmolysée" est instantanément déshydratée sur séchoir rotatif.

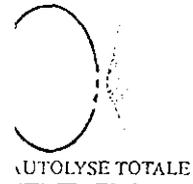


AUTOLYSE PARTIELLE

Après une plasmolyse ménagée, l'activité protéolytique propre des cellules est partiellement mise en œuvre. Une fraction des protéines se retrouve solubilisée, sous forme de polypeptides et d'acides aminés libres.

Cette auto-solubilisation permet d'une part de modifier le goût de la levure, d'autre part d'améliorer sa valeur nutritive en accroissant la fraction protéique solubilisée directement assimilable.

La crème de levure partiellement autolysée est instantanément déshydratée sur séchoir rotatif.

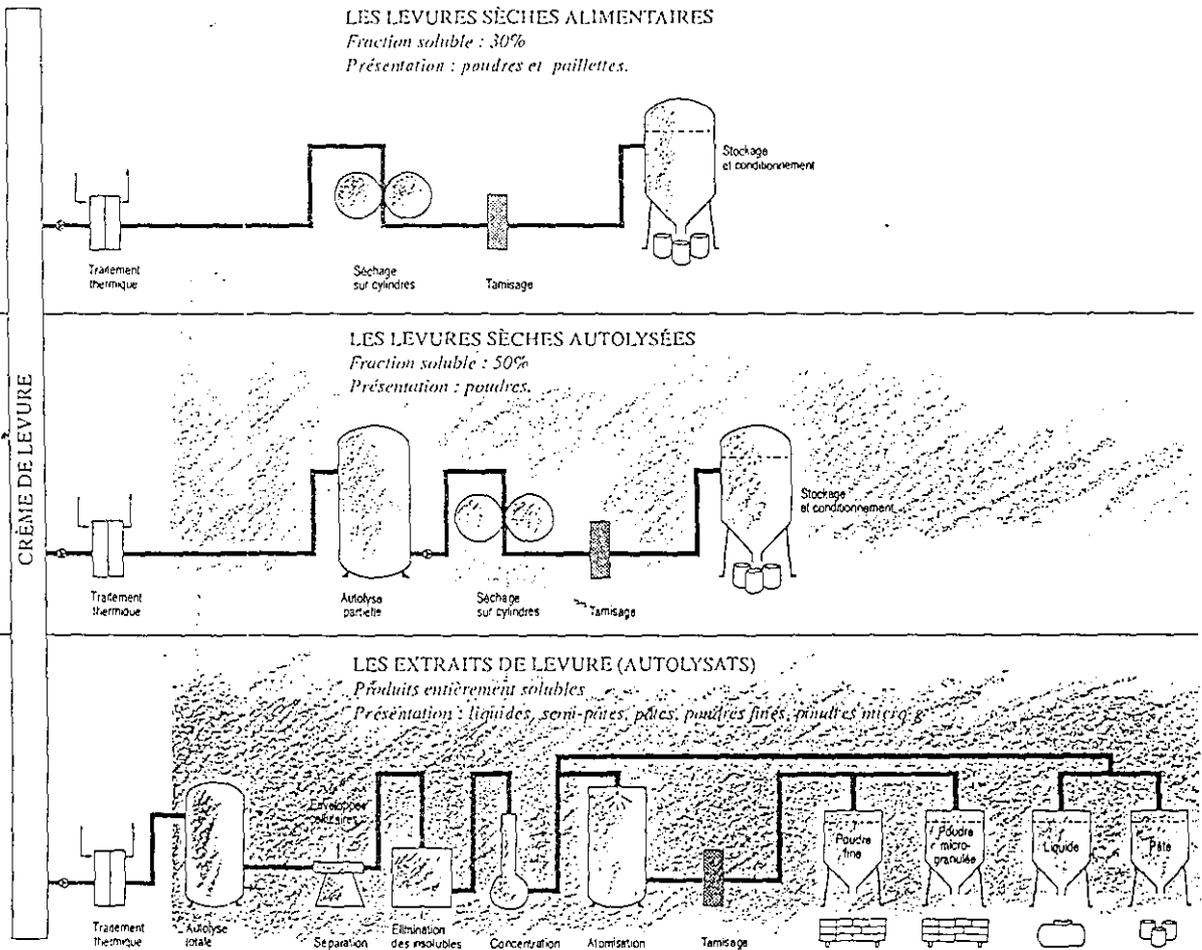


AUTOLYSE TOTALE

Après une plasmolyse ménagée, l'autolyse est optimisée de façon à solubiliser en totalité les protéines des cellules de levure.

En fin d'autolyse, les enveloppes cellulaires, insolubles, sont éliminées par centrifugation. La fraction soluble, constituée principalement de peptides et d'acides aminés libres, est concentrée ou séchée par atomisation.

En ce qui concerne la gomme Springer 2000, un mode différent de solubilisation des protéines permet de préserver, dans l'extrait de levure, les bases nécessaires à l'obtention de nucléotides naturels exhausteurs de goût.



La production à partir du lactosérum peut se faire avec :

- des perméats de lactosérum : la fermentation du lactose, sous conditions fortement aérées pour éviter la formation d'éthanol, peut conduire à une production de biomasse pouvant être séparée du jus de fermentation puis séchée. Un tel produit contient environ 45% de protéines brutes et peut être utilisé comme constituant de l'alimentation animale.
- le lactosérum lui même : la fermentation ne peut avoir lieu qu'avec des espèces sélectionnées et dans un milieu enrichi. Le produit final, ayant une faible teneur en acide nucléiques, est utilisé en diététique. Il sert aussi d'exhausteur de goût (36).

Le produit obtenu présente l'inconvénient lié à la composition irrégulière du lactosérum qui dépend de la provenance de lait et de la période de l'année (32).

- D'autres substrats peuvent être employés : mélasses, moût de céréales, bière, amidon (résidus de pomme de terre ou manioc), cellulose...

- **Produits pétroliers**

On y cultive essentiellement *Candida* et *Pichia*, dont les parois semblent bien résister à l'effet dissolvant des hydrocarbures. Certaines *Candida* (*C.tropicalis* et *C.lipolytica*) peuvent être cultivées directement sur le gazoil. En plus du déparaffinage (par oxydation des alcanes), on assure la production de protéines et vitamines. *Pichia pastoris* est actuellement préférée car elle donne le meilleur rendement en protéines (32, 65).

Un point est consacré à ce type de levures en fin de chapitre.

Geotrichum candidum est également utilisé pour produire de la biomasse et des protéines à partir de différents substrats. Une culture associée *E.coli* et *Geotrichum candidum* permet d'améliorer la valeur biologique des protéines car elles sont plus riches en acides aminés essentiels. Par rapport aux protéines de l'œuf, celles résultant de l'association sont légèrement déficientes en méthionine et cystine. Les richesses protéiques et vitaminiques du mycélium permettent à celui-ci d'être incorporé à l'alimentation humaine ou animale (40).

3.2.3. Procédé Voir photo 10

On réalise des systèmes de culture continue en milieu aérobie.

Après centrifugation, les levures sont séchées de façon ménagée et rapide afin de conserver l'intégralité de leurs facteurs nutritionnels et de les amener à une teneur en matière sèche de 15 à 25 % . Elles subissent alors un traitement qui les inactive, perméabilise ou fait éclater la membrane et augmente leur digestibilité ; enfin, un ultime séchage (32, 30, 65).

3.2.4. Rendement

Les rendements les plus importants sont obtenus sur alcanes (entièrement métabolisés). L'Institut Français du Pétrole obtient des rendements de 95 à 97 % avec *Candida tropicalis*.

Sur résidus agricoles, on ne dépasse jamais des rendements de 50 % mais leurs prix modiques en font des procédés d'avenir (58).

C'est avec les espèces *Candida humicola*, *C.saitoana*, *Kluyveromyces lactis* et *K.marxianus* que l'on obtient les plus fortes productions de biomasse (27 à 33 g/l) à partir de lactosérum.

3.3. UTILISATION EN ALIMENTATION

La levure aliment est une matière aromatique de choix qui a supplanté, tout au moins en partie, les extraits de viande utilisés dans les industries agro-alimentaires.

Dans certains pays, elle est commercialisée sous forme de produit à tartiner pour leur valeur diététique (65).

3.3.1. Avantages

❖ Leur **vitesse** de multiplication végétative est si rapide qu'elles entrent en compétition avec la vitesse de production des aliments carnés. En effet, il faut environ 6 mois pour élever un porc, 2 mois pour un poulet et quelques heures seulement pour avoir une génération de levure.

De même, pour produire 50 kg de protéines, on peut :

- réaliser une culture sur mélasse de 12h
- ou élever un bœuf pendant 30 mois : il transforme les protéines végétales en protéines animales d'une excellente valeur nutritive mais avec un rendement faible (8 kg de protéines végétales donnent 1 kg de protéines animales)

❖ Le **prix** de revient des protéines levuriennes est 10 à 20 fois inférieur à celui des protéines animales, même si la séparation des levures de leur milieu de culture majore parfois le prix de revient.

❖ Les cultures levuriennes aident à la **résorption de résidus** (mélasses, vinasses...) ou polluants (eaux sulfiteuses des papeteries, lactosérum des fromageries...). Le lactosérum devient polluant lorsqu'il est rejeté dans l'eau car les micro-organismes présents dans l'eau, en assimilant le lactose, consomment l'oxygène dissous qui va ensuite manquer à la faune et à la flore aquatique (32).

3.3.2. Rôles en alimentation

3.3.2.1. Humaine

Dans ce point, il ne sera pas question de développer les propriétés de *Saccharomyces boulardii*, levure bien connue des pharmaciens, qui est destinée à un usage plus thérapeutique qu'agro-alimentaire.

Dans les industries alimentaires, les autolysats de levure sont incorporés à raison de 1 à 3 % afin d'enrichir la qualité nutritive des produits alimentaires sans en modifier le goût. Elles peuvent remplacer des adjuvants d'extraction ou de synthèse coûteux, tout en apportant leur potentiel nutritionnel.

Elles ont certaines fonctions :

- ♦ pouvoir **liant** et capacité de **rétention d'eau** : dû à leur richesse en protéines et glucides de structure. C'est un facteur de **cohésion** pour des produits amylacés (pâtes alimentaires, plats cuisinés, croquettes...)

- ◆ facteur **correcteur**, dû à leur richesse en glutathion, de pâtes de céréales (froment) dont elles diminuent la dureté (pâtes feuilletées ou brisées)
- ◆ **agent de sapidité** (malgré sa propre sapidité discrète), **fixateur** et **exhausteur d'arômes**, dû à leur richesse en acide glutamique. Ajoutées aux épices, les levures leur permettent de mieux supporter les traitements thermiques qu'on leur impose. Elles sont également utilisées pour renforcer les arômes des poudres de fromage ou biscuits au fromage, et peuvent remplacer totalement le glutamate de sodium ajouté à la charcuterie, salaisonnerie, aux sauces et potages.
- ◆ **épaississant** thermostable (aliments en petits pots pour nourrissons, sauces, potages...) et **adjuvant évitant le durcissement** des textures (charcuterie, fromagerie) **stabilisant** de la viscosité des pâtes liquides ou semi-liquides : gaufrettes, crêpes ...
- ◆ **adjuvant en techniques de cuisson-extrusion** : leur teneur en lipides et polysaccharides leur permettent de réduire l'expansion diamétrale et longitudinale des produits extrudés et se substituent aux agent émulsifiants
- ◆ Leur richesse en vitamines et protéines en font des adjuvants de choix dans les produits de régime (32, 74).

3.3.2.2. Animale

Depuis une vingtaine d'années, les conditions de production animale sont telles que les élevages deviennent de plus en plus industrialisés pour produire beaucoup, de bonne qualité et vite, d'où le recours quasi obligatoire aux additifs alimentaires. C'est ainsi qu'on assiste au développement de l'« aliment santé » ou « nutraceutique », tant chez l'homme que l'animal (43).

La définition de la levure aliment de la CEE correspond à celle de l'alimentation humaine, mais peuvent être en plus utilisés :

- ◆ *Saccharomyces cerevisiae* récoltées après fermentation de la bière ou des mélasses de betterave pour la production d'alcool ou de levures-aliment
- ◆ *Kluyveromyces fragilis* et *K.dombrowski* cultivées sur lactosérum
- ◆ D'autres espèces pourraient être acceptées après agrément de la CEE (76).

Les levures ont de tous temps fait partie de l'alimentation animale, simplement par le fait qu'elles se retrouvent quasiment partout dans la nature (produits végétaux surtout, acides et à faible activité de l'eau de préférence) (3).

Dès 1935, on a commencé à compléter (3 à 5 % de la ration sèche) l'alimentation des animaux en France, U.S.A et Allemagne. L'apparition en Grande Bretagne depuis 1989 d'encéphalopathies bovines dues à la consommation de sous produits d'abattoirs (os, viscères), présents dans les farines de bétail, donne un regain d'intérêt pour les levures aliment, celles-ci ne pouvant provoquer de tels accidents (74).

L'alimentation animale constitue l'essentiel du marché des levures (32).

3.3.3. Mode d'emploi

La levure aliment peut en effet se consommer :

- ◆ **en l'état** : paillettes, flocons, poudres micronisées qui s'incorporent facilement dans les boissons ou aliments
- ◆ sous forme de **comprimés ou granulés**, facilitant une consommation inter-prandiale ou ambulatoire ; **maltées** (aromatisées à l'extrait de malt pour leur donner meilleure saveur), **extraits solubles** obtenus par autolyse des levures.
- ◆ sous forme de **produits texturés** : après filage des isolats de protéines à l'état de pâte aqueuse, les filaments tenus obtenus sont coagulés puis agglomérés. La texture obtenue ressemble à celle des muscles. On peut y ajouter des arômes qui confèrent à la masse la saveur de la viande ou du jambon. Le produit sec est présenté sous forme de tranches ou granulés. La réhydratation, indispensable pour la consommation, double ou triple son poids.
- ◆ **aliments levurés** : charcuterie, biscuiterie, gressins, petits-déjeuners, pâtes à tartiner, sauces, condiments, aliments diététiques (32).

Produits probiotiques	Micro-organisme composant les produits	Utilisation
Yea-sacc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Polygastriques
Lacto-sacc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Tous les animaux
Biosaf SC 47	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC 47	Tous les animaux et surtout les polygastriques
Enteroferm	3 souches de <i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Saccharomyces</i>	Tous les animaux

Tab.34 : Principaux probiotiques commercialisés en France pour l'alimentation animale contenant *S.cerevisiae* (23)

3.3.4. Propriétés

3.3.4.1. Propriétés chez l'homme

- ◆ améliore l'état général de la peau et des cheveux chez tous les sujets
- ◆ favorise la croissance de l'enfant et de l'adolescent
- ◆ L'addition de 2% de levures à une ration céréalière suffit à mettre un enfant à l'abri des troubles cliniques graves de la malnutrition azotée et du kwashiorkor dans les zones défavorisées. Elles sont donc recommandées dans tous les états de dénutrition, malnutrition, maigreur constitutionnelle quel que soit l'âge
- ◆ augmente la résistance à la fatigue physique de l'adulte, des personnes âgées et du sportif
- ◆ atténue l'asthénie des femmes enceintes et allaitantes, font disparaître les nausées, vomissements et crampes des membres inférieurs

- ◆ augmente la résistance aux infections
- ◆ complément indispensable à l'alimentation des pays industrialisés souvent déficiente en vitamines B
- ◆ source de protéines bien pourvue en lysine qui supplée, comme la viande et les produits laitiers, la déficience des céréales en cet acide aminé indispensable (couvre 1/5 des besoins, particulièrement importants en diététique infantile)
- ◆ relève la saveur fade des régimes sans sel
- ◆ l'azote nucléique stimule le stockage hépatique de la vitamine A (74, 16).

Un apport de 10 à 15 g journalier suffit (74).

Faute de connaissances suffisantes, les doses maximales recommandées sont de 30g/j chez l'adulte (16).

3.3.4.2. . Propriétés chez l'animal

Elles ont un rôle « probiotique » (du grec : en faveur de la vie), c'est à dire qu'elles ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (Fuller, 1989) (43). Chez l'animal, on parlera d'effets zootechniques.

Les probiotiques sont aussi bien utilisés pour les jeunes animaux que pour les adultes.

- ◆ Favorise la prise alimentaire. Le caractère appétent (acide glutamique) des levures permettant d'augmenter la quantité de ration ingérée ; la croissance n'en est que meilleure
- ◆ Améliore la digestibilité des aliments, en particulier la matière azotée
- ◆ Majore le gain de poids
- ◆ En utilisant l'oxygène, elle renforce les conditions d'anaérobiose et stimule la croissance de bactéries anaérobies (1, 31, 76).

Les levures surclassent nettement les tourteaux d'oléagineux et les protéagineux. Seules d'excellentes farines de poisson délipidées peuvent rivaliser avec les levures sèches (1).

Elles sont insensibles aux antibiotiques généralement utilisés en alimentation ou thérapeutique animale (3).

Quelques exemples :

Bovins

Ils représentent de loin les principaux bénéficiaires animaux de levures-aliment.

La pratique démontre l'intérêt de cures de 15 j à raison de 150 à 200 g/j de levure aliment chez les taurillons, en particulier lors d'alimentation à base d'ensilages de maïs (74).

Polygastres adultes, ruminants

A l'inverse des monogastres et de l'homme, ils sont capables grâce aux fermentations ayant lieu dans le rumen, d'assimiler de grandes quantités d'aliments riches en cellulose. L'addition de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) à leur alimentation couramment pratiquée permet un apport protéique et énergétique. Leur développement est consécutif à l'interdiction des anabolisants autrefois couramment employés pour améliorer la prise alimentaire, le gain de poids, la qualité de la viande...(31).

Malgré une multiplication difficile dans le rumen (pH de 6-6,5 contre un pH optimum de 4), l'excrétion de métabolites et de vitamines par *Saccharomyces* est favorisée. Ces derniers sont

alors utilisables par l'animal lui-même ou par les micro-organismes du rumen, parmi lesquels les bactéries cellulolytiques qui se développent plus aisément (31).

Dans un second temps, *Saccharomyces cerevisiae* augmente le pH et favorise ainsi l'activité des bactéries cellulolytiques donc aussi la digestibilité des fibres (31).

Les levures stimulent ainsi la croissance d'autres flores du rumen, soit par assimilation de composés potentiellement inhibiteurs, soit par le relargage de certains métabolites (éthanol, CO₂) (3).

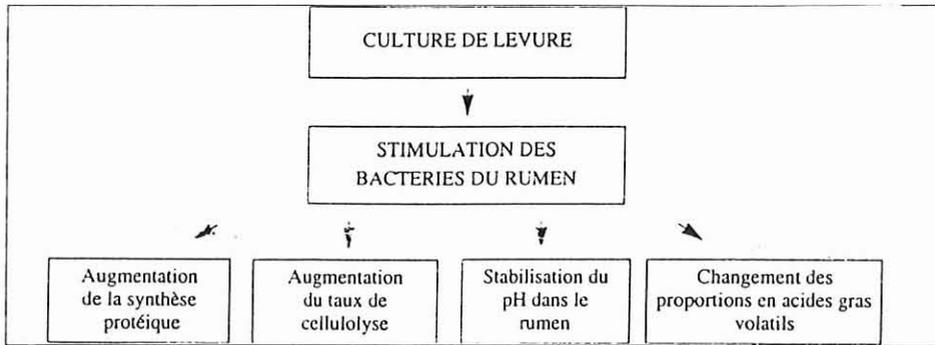


Fig. 36 : Mode d'action des levures (31)

Jeunes animaux

3 à 5 % de la ration alimentaire en levures apportent des facteurs de croissance et une protection sanitaire contre leur grande sensibilité au microbisme des grands élevages (76).

Veaux

Les probiotiques réduisent la fréquence et l'intensité des diarrhées qui apparaissent lors du sevrage, et par là même la mortalité (3).

Les levures apportent les protéines manquant au lactosérum, incorporées à 15 % maximum de la ration. On utilise des poudres très fines qui restent en suspension tout au long de la buvée. Elles doivent être de faible sapidité car les veaux y sont très sensibles (74, 76, 32).

Vaches laitières

500 à 800 g/j aux vaches gestantes de 3 semaines avant le vêlage jusqu'à 10-15 j après, augmente la production de lait et améliore l'état de la vache.

En réduisant la production d'acide propionique et butyrique et en augmentant celle d'acide acétique, elle facilite la digestion des fibres et améliore la qualité (par majoration du taux de matières grasses) et la quantité de lait chez la vache laitière à haut potentiel (VLHP) (31, 76, 74).

Truie

Saccharomyces cerevisiae augmente le nombre de naissances chez les truies en gestation et les nouveaux-nés sont plus résistants et plus vite sevrés (43).

100 à 150 g/j (3 à 6 %) en fin de gestation et pendant l'allaitement, augmentent la lactation de la truie. La levure permet aussi de lutter contre l'anémie par apport d'acide folique (76, 74).

Animaux à fourrure (renard bleu, vison), animaux de compagnie (chiens et chats)

3 à 7 % de levures aliments améliorent de façon spectaculaire la qualité des fourrures, l'état de santé, la reproduction, l'élevage et réduisent la mortalité des jeunes (76, 74, 32).

Aquaculture de mer ou d'eau douce

Les levures peuvent représenter jusqu'à 60 % de l'apport protéique sous forme de paillettes (32, 76). Elles peuvent être la principale nourriture de nombreuses espèces au stade alevin 1^{er} âge. Elles favorisent la prolifération de bactéries chitinolytiques dans le tractus gastro-intestinal de ces poissons, améliorant ainsi leur croissance (74).

Chevaux et poulains

C'est un facteur de croissance exceptionnel pour le poulain dès le 15^{ème} jour de vie (32, 74, 76).

200 à 500 g/j augmentent la résistance à la fatigue de chevaux de course, selon leur poids et le travail demandé (32, 76).

Oiseaux

5 % de levure augmentent leur vitalité, la beauté de leur plumage et permettent des mues sans problèmes (32, 76).

Volailles

3 à 4 % sont indispensables chez les poules élevées en batterie pour leur assurer une bonne santé, de bonnes pontes et des mues normales.

4 à 5 % chez les poussins permettent une croissance plus rapide et une moindre vulnérabilité face aux maladies (32, 76).

Par sa composition, la levure est un aliment efficace pour les animaux de basse-cour. Elle est incorporée aux aliments anti-stress ou produits de traitement. L'effet est marqué sur le taux d'éclosion, d'emplumage et l'état des litières ainsi que la qualité et les performances de la dinde en élevage (nette diminution du tissu adipeux abdominal des femelles) (74).

La ponte des poules est plus régulière (32).

Abeilles

Du fait de sa grande digestibilité et de sa richesse en vitamines, la levure peut entrer dans la composition des substituts de pollen (32, 74, 76). Elles peuvent être utilisées à la fin de l'hivernage, quand les réserves de pollen, qui constituent une assurance pour le développement de la colonie, sont moisies (32).

Lapins et lièvres

Ils sont très friands de levure. 1 à 2 % corrigent les dysfonctionnements intestinaux si fréquents chez ces animaux (74).

3.3.5. Levures cultivées sur hydrocarbures

Dès 1934, Beerstecher dans son ouvrage « Petroleum microbiology », parle de la possibilité de production de matière alimentaire à partir d'hydrocarbures. Il faut attendre la guerre 1939-1945 pour que les études reprennent dans un but pratique cette fois.

C'est dans les années 1957 que A.Champagnat entreprit la culture de levures dans le but de produire des protéines. Une culture de *Candida lipolytica* sur n-hexadécane fut réalisée avec l'obtention assez rapide et encourageante d'un rendement de 50 % de levure sèche par rapport à l'hydrocarbure consommé. Ces recherches menées par l'industrie du pétrole ont été ternies. Comment convaincre les dirigeants de l'industrie du pétrole de s'engager dans la

production d'aliments ? Le pétrole est cancérigène... et la cellule ? Les réactions sont trop lentes pour une production industrielle et le prix de revient est prohibitif...

Les 1^{ères} demandes de brevet B.P. (British Petroleum) ont été déposées le 22 août 1960. La grande presse en a fait un écho démesuré : les uns voyaient poindre la solution totale au problème de la faim, les autres ne cachaient pas leur appréhension. L'appellation « Bifteck de pétrole » a été immédiatement lancée par les journalistes, bien qu'elle soit impropre.

Très vite, le corps médical s'implique ainsi que l'O.N.U., l'U.N.I.C.E.F. et plus tard le Protein Advisory Group. De leur côté, les dirigeants pétroliers ne pouvaient pas abandonner un projet qui suscitait tant d'espoir.

1963 marque le début d'un effort mondial de recherche pour la production de micro-organismes à partir de produits pétroliers (France, Royaume Uni, Tchécoslovaquie, Suède, URSS, USA, Chine, Formose, Inde, Iran, Japon).

Pays	Organisations	Substrats	Microorganismes
FRANCE	Société Française des Pétroles BP Laboratoire de Chimie Bactérienne du C.N.R.S. Institut Français du Pétrole Institut Français du Pétrole + ELF + TOTAL	gasoil	levures
		alcanes anhydride carbonique	levures, bactéries algues
		alcanes	levures
ROYAUME UNI	British Petroleum Shell Imperial Chemical Industries Universités	alcanes méthane méthane et méthanol	levures bactéries bactéries
		hydrocarbures variés	levures, bactéries

Tab.35 : Organismes les plus connus travaillant à la fermentation des hydrocarbures (16)

Divers vocables ont été proposés en retenant la finalité alimentaire : Single Cell Proteins chez les Anglo-saxons, Protéines de Biosynthèse selon l'Académie de médecine en France. L'évaluation par des organismes indépendants de haute réputation internationale, de la qualité de la masse produite a constitué un facteur essentiel du succès du produit.

On a donc obtenu un produit de qualité compétitive avec des farines de poisson et des tourteaux de soja utilisés en alimentation animale. La 1^{ère} usine fut créée en 1967, mais, parallèlement, les essais continuent, notamment ceux de longue durée qui apportent une garantie supplémentaire. Près de 60 000 rats sont utilisés en plusieurs années dans des expérimentations qu'aucun aliment, traditionnel ou non, n'a jamais subis.

C'est en juillet 1970, que l'autorisation d'emploi pour l'alimentation animale des levures cultivées sur alcanes par les procédés B.P. est accordée en France.

Cependant, l'objectif initial étant l'alimentation humaine, un symposium sur les levures cultivées sur alcanes s'est réuni à Aix-en-Provence en 1972. Il a conclu en faveur du passage aux essais cliniques pour l'alimentation humaine directe (16, 65).

Dans les années 1960, la production des Protéines d'Organismes Cellulaires (P.O.U.) à grande échelle (100 000 t/an) à partir d'hydrocarbures a fait naître de grands espoirs. Vers 1970, l'industrie pétrochimique en plein essor finance la recherche consacrée aux P.O.U. d'autant que le pétrole et ses dérivés sont bon marché. Parallèlement, le coût du soja, dont les imports sont considérables, monte. Mais conséquence du choc pétrolier de 1975, le prix du pétrole ne cesse de croître et le soja devient moins onéreux. On s'intéresse donc à des substrats meilleur marché (déchets des industries du bois, déchets agricoles...) (58).

Utilisation des levures B.P. en alimentation animale

Il existe beaucoup plus d'études réalisées qu'en alimentation humaine. Ces levures sont utilisées comme élément protidique et non complément vitamino-protidique en compétition avec les éléments azotés classiques de la zootechnie : tourteaux, farines animales. Les levures B.P. sont :

- aussi riches en protéines que les farines de poisson
- teneur en lysine suffisante même si elle est inférieure aux farines de poisson
- peu de méthionine comme dans les tourteaux oléagineux.

Il n'existe pas de risque d'hypervitaminose B étant donné que les facteurs hydrosolubles du groupe B sont rapidement éliminés par voie rénale. Les seuls risques d'hypervitaminose sont relatifs aux facteurs liposolubles susceptibles de s'accumuler mais qui font totalement défaut dans les levures (16).

- **Volailles** : pas de perturbation de rendement ou de qualité
- **Porc** : pas de modification importante de résultats
- **Veaux** : le seul phénomène à considérer est la concentration élevée en hémoglobine associée à la consommation de levures qui sont riches en fer. Si une telle alimentation place les animaux à l'abri des risques d'anémie, la forte coloration de la viande risque de les déprécier commercialement. La société B.P. commercialise une levure spéciale à faible teneur en fer pour les veaux de boucherie (16).

∴ 3.3.6. Toxicité et innocuité chez l'homme

Le problème des acides nucléiques et de l'acide urique

C'est le problème majeur, d'autant que les P.O.U. ne sont pas les seuls à en renfermer, mais les méthodes de réduction de leur teneur rendent possible la consommation de levures.

Ce point ne concerne que l'homme, les espèces animales étant pourvues d'une enzyme, l'uricase, oxydant l'acide urique en allantoiné, et par là même, évitant son accumulation dans l'organisme.

Chez l'homme, c'est un constituant sanguin normal, mais il devient assez rapidement préjudiciable à la suite d'une moindre élimination rénale provoquant une élévation de la concentration sanguine. Lorsqu'elle atteint 6 à 7 mg/100ml (VN : 4 à 5 mg/100ml), l'acide urique cristallise et forme des dépôts, notamment dans les cartilages, les reins ou la vessie. Le sujet souffre alors d'hyperuricémie avec des crises de goutte ou lithiases rénales. Les levures n'ont cependant qu'une part de responsabilité dans l'étiologie des calculs rénaux.

De nombreux aliments sont riches en azote nucléiques (purines), le plus redoutable étant le thymus (ris de veau). Dès 1974, il est admis que la consommation de 20 à 30 g de levure/j pour un adulte, 15g/j chez l'adolescent, et 10 g/j chez l'enfant ne présente pas de risque (16).

Levures d'alcanes et autres produits pétroliers

Aucune toxicité n'a jamais été démontrée (16, 58).

Des études ont montré que l'ingestion d'hydrocarbures cancérigènes par la consommation de levures cultivées sur substrats pétroliers se révèle bien négligeable par rapport à des habitudes alimentaires courantes. On a même constaté qu'elle étaient 10 fois plus pauvres en hydrocarbures cancérigènes que certains aliments tels que la viande fumée, et toujours moins riche que beaucoup de végétaux comestibles et d'aliments torréfiés consommés journallement sans inconvénients. Cependant, l'homme a toujours tendance à faire confiance au passé et à un usage consacré par la tradition ancestrale. A l'inverse, le progrès effraie (16, 58).

Les levures sur gazoil souffrent généralement de préjugés extrêmement défavorables auprès du public en raison de l'aspect peu engageant de produits comme le bitume, les huiles de graissage, le goudron (qui proviennent de la houille et non du pétrole !). De même, il semble que la consommation de « levures de pétrole », s'identifie plus ou moins consciemment à la consommation de pétrole sous forme de levures. Pourtant, on est à mille lieues de penser que l'on va manger de l'herbe en mangeant un beefsteak. Quoi qu'il en soit, les tests d'innocuité conditionnent l'acceptabilité dans l'esprit du public (16).

En 1974, on conseille les expérimentations sur l'homme mais l'évolution du cours du pétrole a rendu plus avantageux l'utilisation de protéines de soja. Les essais ont donc été abandonnés (16).

CONCLUSION sur les levures-aliment

Plus qu'un additif alimentaire, la levure est à considérer comme un véritable aliment, capable de faire disparaître la malnutrition azotée et de réduire d'au moins 50 % les avitaminoses. En zootechnie, son emploi est encore plus large puisque l'acide nucléique ne constitue pas un obstacle à son utilisation importante (16).

Actuellement, les levures-aliment n'occupent pas la place escomptée dans l'alimentation animale et humaine. Les P.O.U. sont utilisés de façon limitée, probablement pour des raisons de législation, de réticences à l'encontre des biomasses microbiennes, et aussi de la concurrence du soja et autres protéagineux. De plus, au niveau européen, il est indispensable d'écouler les excédents laitiers. La hausse des prix du pétrole a rendu non rentable l'obtention de levures sur hydrocarbures. Les technologies utilisant des résidus ou des déchets polluants se développent et sont devenus fonctionnels sur des substrats les plus divers.

- ♦ les mélasses de canne à sucre qui ne connaissent pas leur plein emploi malgré la conversion d'une grande partie d'entre elles en éthanol.
- ♦ la cellulose : il est à noter que les pays déficitaires en protéines sont souvent bien pourvus en cellulose (32).

PARTIE II

Chapitre III

LES

ALIMENTS

FERMENTES

D'ORIGINE

VEGETALE

1. A base de soja
2. Légumes
3. Cacao
4. Café

De l'épi au moulin, les grains de céréales subissent de nombreuses contaminations : bactéries, levures sauvages, champignons parasites ou moisissures saprophytes. La situation la plus souhaitable est l'obtention du grain sec, dans lequel les micro-organismes disparaissent progressivement. Le risque d'échauffement du grain par les micro-organismes peut conduire à une profonde altération de la matière voire à une destruction du grain par auto-combustion. Cependant, le développement de bactéries dans les ensilages de maïs limite le développement de levures et interdit celui de moisissures. De même, en boulangerie française traditionnelle, le grain apporte avec lui levures et bactéries lactiques qui seront ensuite transmises à la farine lors de la mouture.

Comme pour les bactéries, les populations de levures dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés : *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*...ne donnent généralement lieu qu'à de faibles niveaux de contamination (moins de quelques centaines de germes par gramme de grain). Au contraire, des quantités élevées de levures signalent souvent une humidité élevée à la récolte et/ou un pré-stockage humide avant séchage (10).

1. ALIMENTS FERMENTES A BASE DE SOJA

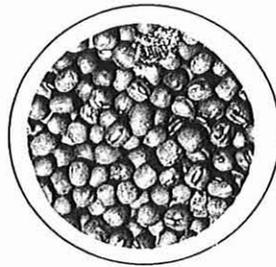


Photo.11 : Grains de soja

Le soja, encore appelé « *soja hispidus* », « *lycine hispida* », ou « *lycine max* », est une plante herbacée annuelle, dont les fruits, des gousses, contiennent 5 graines globuleuses riches en protéines (38 %). Elles sont en outre d'excellentes sources de magnésium, d'oligo-éléments et de vitamines du groupe B. Il ne faut pas confondre la graine de soja, ou le haricot mungo qui donne des pousses dites « de soja » (9, 38).

Sa consommation se fait principalement sous forme d'aliments fermentés, la fermentation permettant d'améliorer sa digestibilité et sa valeur nutritionnelle (9).

L'Asie est riche en produits traditionnels fermentés à base de soja (9).

Il existe différents types de présentations :

- ◆ Agent d'aromatisation dans les aliments : sauce de soja
- ◆ Aliment de base pour les soupes : « miso » japonais
- ◆ Condiment : « sufu » en Chine, « natto » au Japon
- ◆ Plats principaux : « tempeh » en Indonésie, le « tofu »
- ◆ Lait fermenté et fromages (9).

L'espèce la plus fréquemment utilisée est *Zygosaccharomyces rouxii*, mais on emploie aussi *Candida versatilis* et *C. etchellsii* (45).

1.1. SAUCE DE SOJA

Liquide salé brun foncé permettant de rehausser le goût des viandes, légumes ou poissons, c'est probablement le plus vieil assaisonnement préparé par l'homme. Son goût et son arôme plaisants sont principalement dus à l'activité levurienne (45).

Elle peut être nommée différemment : « kecop » en Indonésie, « chiang-yui » en Chine, « kanjang » en Corée. Le goût et la composition peuvent varier. La sauce de soja japonaise, le « shoyu », est consommée à raison de 10 l/an/hab. (9).

Pour la fabrication du « shoyu », une pâte réalisée à partir du « koji » (très amer) est mise en saumure (on obtient alors le « moromi ») puisensemencée par un pédictoque qui produit de l'acide lactique et ensuite par une levure (*Zygosaccharomyces rouxii*) qui produit l'éthanol (38, 48).

On appelle « koji » une famille de produits à base de grains (riz, soja...) fermentés par des moisissures amylolytiques. Certains sont consommés directement (« tempeh »), d'autres servent de substrats pour d'autres fermentations (saké, sauce de soja, miso...) (9, 38).

1.2. MISO

Le miso est obtenu par mise en saumure du koji puisensemencement par des bactéries lactiques et des levures (*Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulopsis versatilis*...) (38).

Ce sont les bactéries lactiques qui, en abaissant le pH, favorisent la croissance des levures (9). Même si *Z.rouxii*, levure halophile, est la principale levure impliquée dans la fermentation du miso, sa croissance est néanmoins affectée par la concentration saturante de chlorure de sodium nécessaire pour inhiber le métabolisme de la moisissure (*A.orizae*) présente dans le koji (45).

Pâte épaisse, il sert d'ingrédient dans les soupes. Il peut aussi être cuisiné et sert également à l'assaisonnement de viandes, poissons et marinades de par son goût salé (45).

1.3. TEMPEH

C'est l'un des aliments fermentés les plus populaires en Indonésie où il représente une source importante de protéines, calories et vitamines... ce qui lui vaut d'être exporté aux USA et consommé par les végétariens sous forme de « tempeh-burger ».

On peut noter la présence de levures dans le produit mais elles n'ont pas de rôle majeur (9).

1.4. INTERET NUTRITIONNEL

L'intérêt de ces produits orientaux fermentés à base de soja est multiple :

- ◆ Consommés depuis 1500 à 3000 ans en Corée, Chine, Japon ou Indonésie
- ◆ Fabrication traditionnelle récemment industrialisée
- ◆ Source de protéines qui remplace efficacement la viande
- ◆ Absence de graisses animales saturées
- ◆ Riches en oligo-éléments et vitamines (surtout vitamine B₁₂ qui représente l'une des principales carences des végétariens) (9).

Ils sont tous constitués de macro-nutriments (glucides, protides et lipides) sous une forme très dégradée qui permet l'alimentation des cosmonautes ou l'alimentation artificielle de certains malades des services de réanimation. L'absorption de ces éléments (acides gras libres et acides aminés libres) se fait très haut dans le tube digestif (duodénum) pratiquement en l'absence d'enzymes biliaires et pancréatiques. Il ne peut y avoir d'assimilation plus facile (9).

Glucides	Peu (2 à 15 %) Absence de lactose : intérêt en cas d'intolérance
Lipides	Acides gras poly-insaturés dont les acides gras essentiels Absence de cholestérol
Protéines	Acides aminés libres, acides aminés essentiels correspondant aux besoins de l'adulte
Micro-nutriments	Vitamines du groupe B (B ₁₂ surtout) Fer. calcium. phosphore. sodium. magnésium...

Tab.36 : **Composition** (9)

En conclusion, c'est donc un bon substitut de la viande mais, alors que les USA l'ont déjà adopté, l'Europe offrira plus de résistance de par ses traditions culinaires profondément ancrées (9).

2. LEGUMES FERMENTES

En Afrique, de nombreux produits entrant dans l'alimentation de base sont fabriqués par fermentation de manioc ou maïs par des bactéries lactiques et des levures. Si elle reste un moyen de conservation important dans les pays en voie de développement, seuls 3 produits, qui ont d'ailleurs pris une importance industrielle (choucroute, concombres et olives) sont encore utilisés dans les pays occidentaux.

La fermentation spontanée des légumes est peu l'affaire des levures mais bien celle des bactéries lactiques (9).

♦ *Olives grecques*

La salinité élevée (7 à 15% de NaCl) ne permet qu'une fermentation acétique par des levures osmo et acido-tolérantes(9).

♦ *Choucroute*

Les levures présentes à l'encuvage subsistent mais se développent peu (9).

♦ *Amidon aigre de manioc*

Le manioc est un tubercule riche en amidon, très utilisé dans de nombreux pays tropicaux, auquel on fait subir des processus fermentaire qui conduisent à des farines ou pâtes acides (gari, fufu, peuyeum...). Les levures interviennent dans la modification des propriétés de l'amidon (pouvoir de panification) et dans la détoxification (38).

3. FERMENTATION DU CACAO

Les fruits du cacaoyer (*Theobroma cacao*), les « cabosses », contiennent 30 à 40 graines (fèves). Chacune d'elle est constituée de 2 cotylédons, enfermés dans une coque et entourés d'une abondante pulpe mucilagineuse (38, 9).



Photo.12 : Un cacaoyer de Guadeloupe, et ses fruits, les cabosses (mars 2000)

Après la récolte, les cabosses sont brisées (écabossage), les graines extraites et mises immédiatement en tas sur des feuilles de bananier, dans des paniers d'osier ou caisses de bois, au fond troué, pour permettre l'écoulement des jus. A intervalles réguliers, les graines sont brassées. C'est la fermentation du cacao qui dure, selon les variétés, le climat, et les habitudes, de 2 à 8 jours. Ensuite, les fèves sont séchées jusqu'à une teneur en eau de 7 % qui permet leur conservation, torréfiées puis broyées pour obtenir la poudre de cacao.

La fermentation vraie a lieu dans la pulpe alors que les réactions biochimiques ont lieu au sein des cotylédons. Cette fermentation permet d'éliminer le mucilage extérieur par pectinolyse, de supprimer le pouvoir germinatif, et surtout rendre possible le développement de précurseurs de l'arôme du chocolat au sein des cotylédons (9, 38).

Dans la cabosse, les graines et la pulpe sont stériles jusqu'à l'écabossage, opération au cours de laquelle elles sont contaminées par les micro-organismes de l'environnement (air, insectes, mains des travailleurs, outils, matériels...) (9). Elles subissent donc une fermentation spontanée d'abord à des levures en anaérobiose (*Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces* et *Candida*) puis à des bactéries acétiques en aérobiose. Les levures détruisent le mucilage et produisent l'éthanol qui va servir aux secondes (9, 38).

3.1 Phase anaérobie

L'absence d'air (par son abondance, la pulpe forme autour des graines une sorte de ciment et empêche la pénétration d'air dans la masse de cacao), la présence de la pulpe sucrée et le pH bas (3 à 3,5), forme un milieu favorable au développement des levures.

Dès l'inoculation, leur nombre est très important (2.10^6 à 3.10^7 cellules/g). Elles occupent le centre de la masse de cacao plutôt que la surface (9).

Très vite, le milieu devient anaérobie et enclenche réellement le processus de fermentation des levures : elles transforment les sucres de la pulpe en éthanol et CO_2 . Cette réaction est légèrement exothermique.

En outre, les levures :

- ◆ consomment l'acide citrique de la pulpe donc élèvent le pH aux alentours de 4
- ◆ certaines sécrètent des enzymes pectinolytiques qui détruisent la pulpe et provoquent son écoulement sous forme de jus. En conséquence, des espaces interstitiels apparaissent entre les graines, favorisant une micro-pénétration de l'air.

La fermentation alcoolique est rapide (24 à 48h en général).

3.2. Phase aérobie

Le milieu transformé par l'action des levures permet l'implantation des bactéries (9).

LEVURES	AMÉRIQUE	AFRIQUE	ASIE
<i>Brettanomyces custersii</i>		x	
<i>Candida humicola</i>		x	x
<i>Pichia norvegensis</i>		x	
<i>Candida sake</i>		x	x
<i>Candida valida</i>		x	
<i>Candida zeylanoides</i>		x	x
<i>Candida krusei</i>	x	x	x
<i>Sporopachydamia lactitivora</i>		x	
<i>Debaryomyces spp</i>			x
<i>Saccharomyopsis fibuligera</i>		x	
<i>Hanseniospora spp</i>			x
<i>Hansenula holstii</i>	x	x	x
<i>Kloeckera apiculata</i>	x	x	x
<i>Kloeckera corticis</i>		x	
<i>Kloeckera javanica</i>		x	x
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>		x	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	x	x	x
<i>Rhodotorula spp</i>			x
<i>Zygo saccharomyces bailii</i>		x	x
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	x	x	x
<i>Torulospora rosei</i>	x	x	x
<i>Saccharomyces chevallieri</i>	x	x	x
<i>Saccharomyopsis spp</i>	x	x	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	x		x
<i>Candida famata</i>	x	x	x
<i>Candida castellii</i>	x	x	x
<i>Torulospora delbrueckii</i>		x	x
<i>Candida holmlii</i>	x	x	x
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		x	x
<i>Trichosporon pullulans</i>	x	x	

Les souches en gras sont toujours et partout présentes

Tab.37 : Souches de levures isolées dans le cacao en fermentation (9)

Perspectives

La fermentation du cacao étant une opération entièrement naturelle et spontanée, l'action des micro-organismes est très aléatoire. Le levurage pose certains problèmes :

- ◆ Le nombre très élevé de levures présentes spontanément a fait que la souche introduite (*Saccharomyces chevalieri*) était minoritaire par rapport à la flore naturelle,
- ◆ Difficultés d'ensemencement de bactéries d'où l'absence de phase acétique,
- ◆ Le milieu aqueux a provoqué la germination des graines (15).

Contrôle

La vitesse d'échauffement des fèves renseigne sur le type de fermentation en cours (alcoolique ou acétique). La quantité d'énergie dégagée indique le degré de fermentation donc le degré de développement de l'arôme du cacao. Ce contrôle, permettant la détermination des moments les plus favorables pour réaliser les brassages, les aérations et décider ainsi la fin de la fermentation, a donné d'excellents résultats au plan qualitatif mais il permet seulement de suivre le fonctionnement microbien et non de le gouverner (9).

4. FERMENTATION DU CAFE

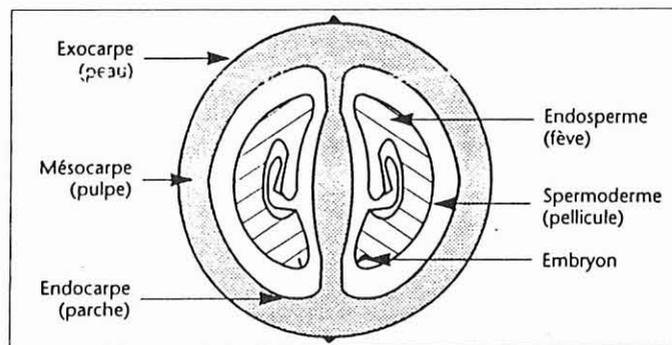


Fig.37 : Coupe d'une cerise fraîche de café (9)

Le fruit du caféier est une drupe, appelée cerise, qui pousse en grappes. Elle est constituée d'une peau rouge à maturité (exocarpe), d'une chair mucilagineuse (mésocarpe) et de 2 graines opposées par leur face plate. La graine (ou endosperme) contient l'embryon, ou germe. Chacune est recouverte d'une pellicule « argentée » (le spermoderme) et entourée par la parche (endocarpe) (9).

Le but essentiel de la fermentation est l'hydrolyse du mucilage qui se détache ensuite de la parche et se solubilise partiellement. Il ne reste plus alors qu'à laver le grain pour obtenir le café en parche humide puis à le sécher.

L'abondance d'hydrates de carbone dans le milieu favorise la prolifération d'une flore microbienne spontanée en quantité suffisante pour renforcer l'action pectinolytique des enzymes pré-existantes dans le mucilage. Cette flore se compose de bactéries, moisissures et levures (genre *Saccharomyces* : 10^7 à 10^8 cellules/g) (9).

La fermentation naturelle dure généralement de 12 à 72h mais elle peut varier selon la température, le procédé employé et l'abondance du mucilage (les cafés Arabica nécessitent une fermentation plus longue car ils sont plus riches en mucilage que le café Canephora variété Robusta) (9, 38).

PARTIE II

Chapitre IV

LES

ALIMENTS

FERMENTES

D'ORIGINE

ANIMALE

1. Fromages
2. Kéfir
3. Produits carnés

1. FROMAGES

La présence de levures dans les fromages n'est pas inattendue compte tenu du pH acide, de la faible activité de l'eau, et de la teneur élevée en sel, ainsi que du stockage au froid des produits (44).

Les levures représentent une part importante de la microflore de nombreux fromages faits, particulièrement les Bleus, St Nectaire, St Paulin, Cantal mais elles apparaissent au second plan (22).

Ces micro-organismes font partie de la flore normale du lait cru (environ 10^4 UFC/ml) et sont presque entièrement détruits par pasteurisation (40).

Ils sont présents à tous les stades de la fabrication du fromage à raison de 10^6 et 10^8 cellules/g (44).

Quelques espèces dominent : *Saccharomyces (cerevisiae, fragilis, lactis)*, *Torulopsis*, *Candida (versatilis, lipolytica, paralipolytica)*, ainsi que *Kluyveromyces (marxianus, bulgaricus, fragilis)*, *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces rouxii*. Chaque pâte se différencie par leur importance relative, voire l'existence de certains genres (*Pichia, Rhodotorula, Hansenula...*) (44, 52, 40).

La flore varie selon la technique fromagère, en particulier le salage, qui sélectionne des levures tolérantes au sel en surface puis dans le fromage au fur et à mesure de la pénétration (52). Avant salage, les principales espèces sont identifiées comme des levures fermentant le lactose :

- *Kluyveromyces marxianus var. lactis* et sa forme imparfaite (*Candida sphaerica*) qui représente 34% de la population
- *Candida lipolytica* (44).

1.1. ESPECES DOMINANTES DANS QUELQUES FROMAGES (44)

Fromages	Souches
Camembert	<i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Geotrichum</i>
Fromages au lait de chèvre	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida robusta</i> , <i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i> , <i>Candida sphaerica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Candida lipolytica</i>
Roquefort	<i>Kluyveromyces marxianus var. marxianus</i> , <i>K. marxianus var. lactis</i> , <i>Candida sphaerica</i> . Les levures dans le caillé fermentent le lactose et ouvrent la texture, facilitant ainsi la pénétration de <i>Penicillium roquefortii</i> , responsable de la maturation

Tab.38 : Levures présentes dans quelques fromages (44)

Geotrichum candidum

Intermédiaire entre moisissure et levure, aérobic strict, il s'implante tôt à la surface des fromages (2).

Alors qu'il y a encore peu de temps sa présence était considérée comme un défaut de la flore de surface de certains fromages tels que les Bries et Camemberts, cette espèce est aujourd'hui recherchée comme facteur de qualité. Elle est utilisée pour le feutrage des pâtes molles à croûte fleurie en association à *Penicillium*. A la fois protéolytique et lipolytique, elle joue un rôle capital dans l'aromatization des fromages : réduit la production de diacétyle et développe les précurseurs d'arômes (2, 9, 7).

Elle présente également un effet améliorant sur la qualité organoleptique : elle sécrète des estérases qui entraînent la production d'esters à l'origine de l'odeur caractéristique de ces fromages. De plus, elle réduit l'amertume des fromages à croûte fleurie (Camembert) par réduction du niveau d'action de la protéase acide du *Penicillium* et donc de la production du taux de peptides amers. Son association avec *Brevibacterium linens* a également été reconnue nécessaire pour son effet de neutralisation du pH. Dans les fromages à base de lait de chèvre, des études ont mis en évidence que cette souche représentait parfois plus de 60 % des micro-organismes (40, 2).

Elle intervient également dans l'inhibition de la microflore indésirable (7).

1.2. ROLES DES LEVURES EN FROMAGERIE

1.2.1. Fermentation alcoolique du lactose; assimilation du lactose et de l'acide lactique Inhibition ou stimulation du développement d'autres micro-organismes

Ex : *Kluyveromyces (marxianus var.marxianus, marxianus var.lactis)*, *Candida (sphaerica, famata, versatilis)*, *Debaryomyces*, *Torulopsis* (38, 40).

Quand les levures sont présentes en nombre raisonnable, la fermentation du lactose participe à la formation de l'arôme, contribue à l'ouverture de la pâte par la production de CO₂, et élimine le risque de gonflement tardif après le pressage (40).

La neutralisation progressive de la pâte par consommation de l'acide lactique et des lactates (formés par dégradation du lactose par les bactéries lactiques) et par production d'ammoniaque est indispensable pour le développement de la flore bactérienne acido-sensible et empêcher le développement de micro-organismes indésirables (40, 44, 52).

Les levures de type *Debaryomyces hansenii* ont certains effets inhibiteurs sur *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyricum* (44).

Toutefois, une fermentation trop active du lactose peut aussi provoquer des accidents tels que l'apparition d'une ouverture anormale si le fromage n'est pas suffisamment poreux ou l'apparition d'un goût de levure (52, 44, 9, 40).

Candida et *Geotrichum candidum* participent activement à l'élévation du pH des fromages (40).

A l'opposé, en libérant des vitamines, nucléotides, peptides et autres métabolites, comme lors de l'éclatement de levures non osmotolérantes au moment du salage, les levures stimulent la croissance d'autres micro-organismes tels que les lactobacilles (52) ou d'autres levures (*Candida lipolytica* active la fermentation par *Geotrichum candidum* (44).

1.2.2. Lipolyse et protéolyse avec action sur la texture et la saveur du fromage (52, 44, 40, 9, 22)

Ex : *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida (lipolytica)*, *Geotrichum candidum*

L'espèce la plus protéolytique est *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*

Par leurs propriétés lipolytiques et protéolytiques, les levures produisent des précurseurs d'arômes responsables de la saveur typique de ces fromages : alcools (isoamylique), aldéhydes (acétaldéhyde), esters (acétate d'éthyle), acides gras volatiles.

La protéolyse met en jeu des activités principalement exopeptidasiques (aminopeptidase et carboxypeptidase). A partir d'acides aminés, certaines levures vont produire des alcools (4). Cette propriété peut être comparable à celle de *Penicillium camembertii* (44, 9).

Levures et *Geotrichum candidum* jouent un rôle non négligeable dans les modifications de texture, l'assouplissement de la pâte et contribuent à donner aux fromages leur saveur caractéristique (40).

1.2.3. Morgeage (morge = substance visqueuse qui recouvre le gruyère) (44).

1.3. SELECTION DE SOUCHES

La sélection des souches de levure se fera selon plusieurs critères :

- fermentation ou assimilation du lactose
- pouvoir neutralisant par assimilation de l'acide lactique et l'acide citrique
- croissance à basse température et à pH acide
- halotolérance : tolérance aux concentrations de NaCl élevées
- production d'enzymes protéolytiques et lipolytiques extracellulaires : *Kluyveromyces marxianus* et *Debaryomyces hansenii* (donc la saveur)
- teneur en vitamines B
- du croûtage, de la couleur des colonies
- caractère aérobie/anaérobie (44, 40).

Malgré leurs rôles reconnus, les levures sont peu utilisées comme ferment car leur maîtrise est difficile et les fromagers préfèrent l'emploi d'autres micro-organismes. La principale utilisation des levures d'origine laitière est la valorisation du lactosérum par la production de levures-aliment (52).

Les fromagers ont à leur disposition des levures qui deviennent indispensables. Le pouvoir aromatique d'une souche est le grand axe de recherche actuel des fabricants de ferments (59), ces derniers devant reproduire des arômes et une texture de fromage comparable à ceux de la fabrication artisanale. Parmi ces mélanges, on retrouve *Geotrichum candidum* et des levures dites de saveur ou de maturation (29).

2. LES KEFIRS

En matière de consommation alimentaire, la tendance actuelle dans les pays occidentaux est aux produits allégés à caractère diététique. Ainsi, les produits issus de la fermentation alcoolique et allégés en alcool (bière, vin, cidre) font appel à des techniques d'extraction, à des coupages avec des liquides non alcoolisés, ou encore à des fermentations incomplètes. Dans ce contexte, les kéfirs de fruits pourraient trouver leur place (51).

Le kéfir, également écrit kéfyr ou képhyr, est le plus célèbre et le plus ancien des laits fermentés acido-lactiques. Produit traditionnellement dans le Caucase septentrional à partir de lait de vache, brebis ou chèvre (ce breuvage était connu sous le nom d'« airan »), il est maintenant fabriqué industriellement dans quelques pays au premier rang desquels figure l'ex Union Soviétique (9, 18, 45).

Ce sont des boissons gazeuses peu sucrées, légères en alcool (moins de 1 %) et contenant des acides organiques et des vitamines. Il résulte de l'association de bactéries lactiques et de levures qui produisent une fermentation principalement lactique et faiblement alcoolique du grain de kéfir. La boisson lactée se caractérise par un aspect lisse et mousseux, une consistance crémeuse, un goût plus ou moins acide, piquant et levuré (9, 18, 51).

Il faut éviter toute confusion entre le grain de kéfir qui comporte le ferment, et le kéfir lui-même, qui définit la boisson proprement dite (18, 51).

Il existe deux types de kéfirs :

- 1) Le *kéfir lacté*, le plus connu, résulte de la fermentation du lait de jument, chèvre ou vache. C'est en Russie qu'il est le plus populaire avec une consommation annuelle de 5 l par habitant (18, 51).

Sa composition microbienne dépend non seulement des méthodes de culture, mais également de l'origine géographique des grains. Les concentrations de levures, très variables selon les auteurs, sont toujours supérieures à celles des bactéries.

Le nombre d'espèces isolées est important surtout parmi les levures ne fermentant pas le lactose (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.unisporus*). Parmi celles fermentant le lactose, les deux espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Candida kefir* et *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* (18, 45, 40).

- 2) Le *kéfir sucré*, qui provient de la fermentation lactique et très légèrement alcoolique d'eau sucrée. C'est une boisson très rafraîchissante, légèrement pétillante, peu sucrée et peu alcoolisée (< 1 % d'alcool). Ce kéfir est assez peu connu. Il n'a encore jamais été commercialisé et il est d'ailleurs impossible de trouver le ferment (grain de kéfir sucré ménager), peut-être parce qu'il n'est pas hygiéniquement irréprochable. Cependant, certaines familles françaises le transmettent depuis plusieurs générations car le grain se multiplie assez rapidement et se conserve très facilement dans de l'eau à 4°C. Le kéfir sucré représente un créneau commercial face à la demande croissante de boissons pétillantes non alcoolisées et moins sucrées. Il ne bénéficie pas encore de l'essor industriel connu pour le kéfir lacté (18, 51).

Pour le kéfir sucré, les levures se situent principalement à la périphérie des grains. Elles sont amplement détachées lors des différents rinçages et repiquages des grains, ce qui diminue leur population et explique en partie leur pourcentage assez faible par rapport aux bactéries (3 % de levures contre 97 % de bactéries). Mêlées aux levures et immédiatement sous cette couche, se trouve la population bactérienne la plus dense du grain. Les parties internes du grain sont très peu colonisées même si certaines bactéries peuvent s'infiltrer par des fissures créées par le dégagement gazeux au cours de la fermentation. Parmi les levures, on trouve : *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Kloeckera apiculata*, *Candida lambica* et *Candida valida* (18, 40, 51).

L'origine du kéfir sucré n'est pas établie et on ne sait pas s'il existe un lien avec le kéfir lacté. Il est certain, par contre, que ces grains sont incapables de fermenter le lait.

2.1. LE GRAIN DE KEFIR

Composition

Il se compose à 24 % de polysaccharides dans le grain de *kéfir lacté*, contre 99 % dans le grain de *kéfir sucré* (18).

La présence de levure telle que *Saccharomyces florentinus*, est importante puisque cette souche intervient dans la formation de liaisons des unités glucose qui les composent (18).

Structure

On distingue une couche extérieure de polysaccharides et une autre, intérieure, plus spongieuse, qui correspond à la zone de fission du grain. En effet, lors de la fermentation, les grains augmentent en taille et se divisent à cause de la pression de gaz carbonique dégagée par la fermentation levurienne.

Microflore

Les grains de kéfir contiennent des agglomérats de micro-organismes (bactéries lactiques et levures en symbiose) agglutinés par un mélange complexe de caséine et de métabolites (45).

2.2. INTERACTION ENTRE LES MICRO-ORGANISMES

Le kéfir sucré possède une particularité étonnante : il peut fermenter pendant des années des milieux pauvres en azote (et en facteurs de croissance) alors que l'on connaît les exigences nutritionnelles des bactéries lactiques. De plus, le sucre disponible est le saccharose et certains micro-organismes du grain sont incapables d'utiliser ce sucre ou l'utilisent très tardivement. On peut donc supposer qu'il y a symbiose entre, d'une part, les levures qui profitent des produits du métabolisme bactérien et d'autre part, les bactéries qui bénéficient des vitamines et des acides aminés produits par les levures ou libérés lors de leur lyse.

Il en est de même pour le kéfir lacté où la source principale de carbone est le lactose, que la plupart des levures du grain ne fermente pas. On a suggéré que les bactéries hydrolysent le lactose en glucose et galactose, ceci permettant le développement des levures (18, 51).

Au début de la fermentation, le saccharose est la seule source de sucre disponible. L'hydrolyse en glucose et fructose par *Zygosaccharomyces florentinus* permet un démarrage rapide de *Lactobacillus hilgardii*.

Très rapidement, seuls le glucose et le fructose sont disponibles. La production d'acide lactique par *Lactobacillus hilgardii* est alors stimulée par les acides organiques libérés par la levure et par la concentration en CO₂ déjà importante. Le pH bas favorise aussi la production d'acide lactique. La phase de dégénérescence des lactobacilles est freinée d'où le maintien quantitatif de la flore. L'acide lactique excrété par ces derniers inhibant les levures, leur présence n'excède pas 1 à 5 % et la production d'alcool est faible (51).

2.3. CONSERVATION DES GRAINS

L'intérêt du kéfir réside dans l'auto-immobilisation des micro-organismes dans le gel qui permet de récupérer très facilement le ferment et perpétuer la fabrication de la levure pendant des années. Ce gel semble agir comme un protecteur des cellules : on peut conserver les grains à 4°C dans de l'eau préalablement bouillie pendant un mois. Pour une conservation plus longue, on peut envisager de congeler ou de lyophiliser les grains, ou simplement de les sécher par une méthode traditionnelle. Ils peuvent être cultivés pendant 10 ans intacts, ce qui est loin d'être le cas si on utilise un ferment non fixé.

Une autre particularité du grain de kéfir est la stabilité des populations microbiennes qui le composent malgré une utilisation dans un milieu non aseptique (18, 51).

2.4. FABRICATION TRADITIONNELLE

La préparation du levain repose sur l'emploi de grain de kéfir, agrégat blanchâtre, irrégulier, à consistance gélatineuse, qui renferme la flore complexe de bactéries lactiques et de levures (dont *Candida kefir* et *Saccharomyces cerevisiae* qui interviennent successivement dans l'élaboration du produit). L'emploi des grains persiste dans la fabrication industrielle car les flores simplifiées non directement issues des grains ne sont pas pleinement satisfaisantes (9).

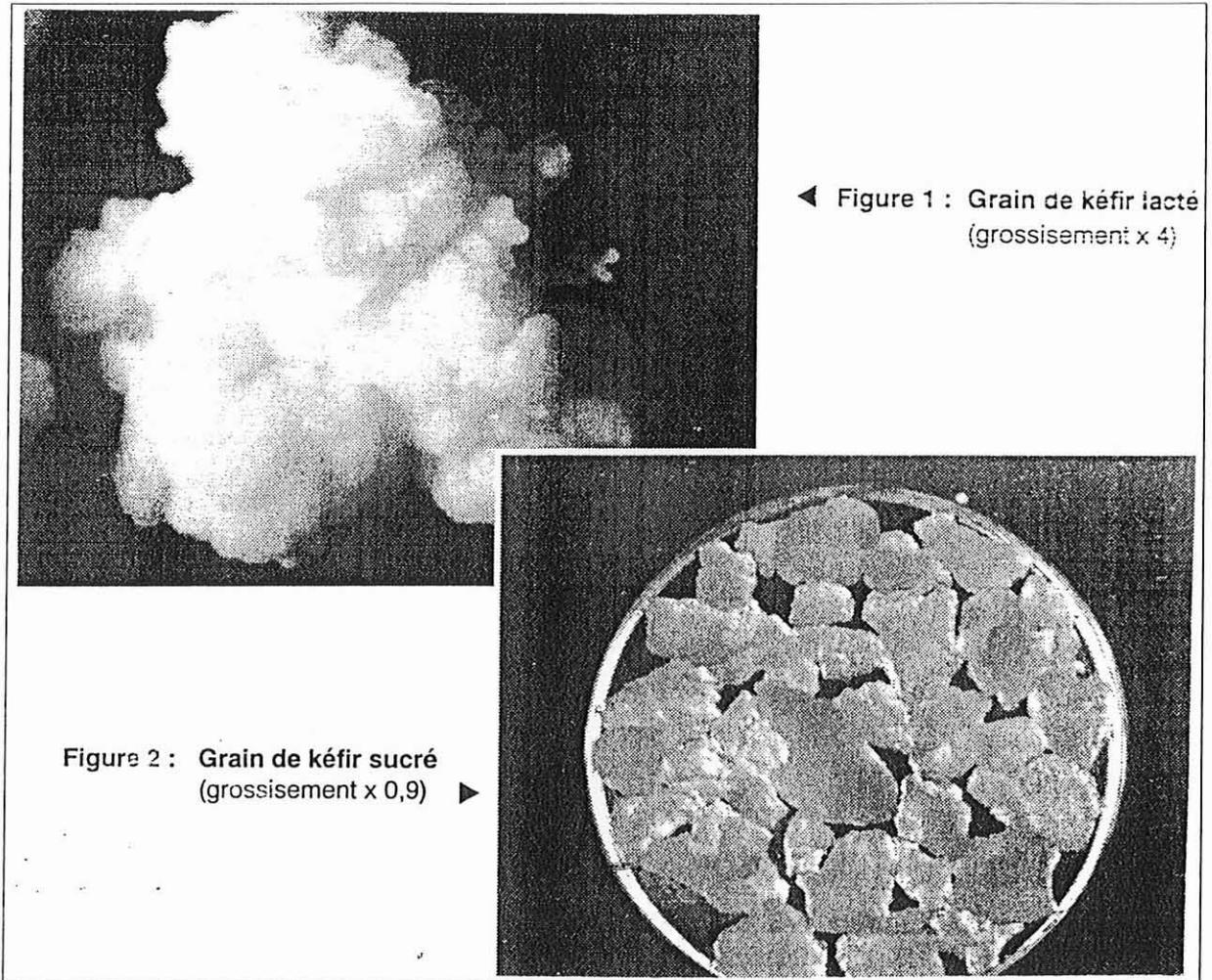


Photo.13 (18)

2.4.1. Fabrication du kéfir lacté

Pendant longtemps, le kéfir de lait fut préparé au foyer ou artisanalement. La production industrielle n'a débuté qu'au début des XIX et XX^{èmes} siècles.

On additionne au lait pasteurisé refroidi 2 à 10 % de grains. Il y a fermentation pendant 24 heures puis maturation. Les grains, récupérés par tamisage, peuvent être réutilisés pour un nouveau cycle de fermentation.

Plusieurs méthodes existent :

- 1) Préparation à partir d'une culture mère : c'est la technique russe par excellence qui consiste à préparer extemporanément le ferment à partir d'un mélange de grains et de lait. Après 24 heures, le ferment est prêt, filtré puis mélangé à du lait frais pour une seconde fermentation de 12 à 18 heures.
- 2) Préparation à partir du kéfir lui-même : ce procédé consiste à ajouter du lait à du kéfir préparé par la technique précédente, c'est à dire qu'à la fin de la seconde fermentation, le lait fermenté joue le rôle de ferment pour une troisième fermentation de 8 à 20 h suivie d'une maturation très variable (12 h à 7 j) (18).

2.4.2. Fabrication du kéfir sucré *Voir figure 38*

La figue est le témoin d'avancement de fermentation. Elle remonte à la surface quand elle est gorgée de CO₂. Elle est peut-être aussi une source d'azote et de facteurs de croissance pour la microflore du grain. On peut utiliser du sucre de canne roux qui, non raffiné, apporte lui aussi quelques éléments importants pour la survie des micro-organismes. La figue, associée au citron, donne l'arôme caractéristique du kéfir sucré.

L'activité des bactéries est stoppée mais les levures travaillent encore un peu et la boisson est ainsi regazéifiée.

Un nouveau cycle de fermentation peut alors recommencer après un éventuel rinçage des grains à l'eau pour les débarrasser de l'acidité interne qui peut gêner la survie de la microflore (18, 51).

2.5. CARACTERISTIQUES DE LA BOISSON

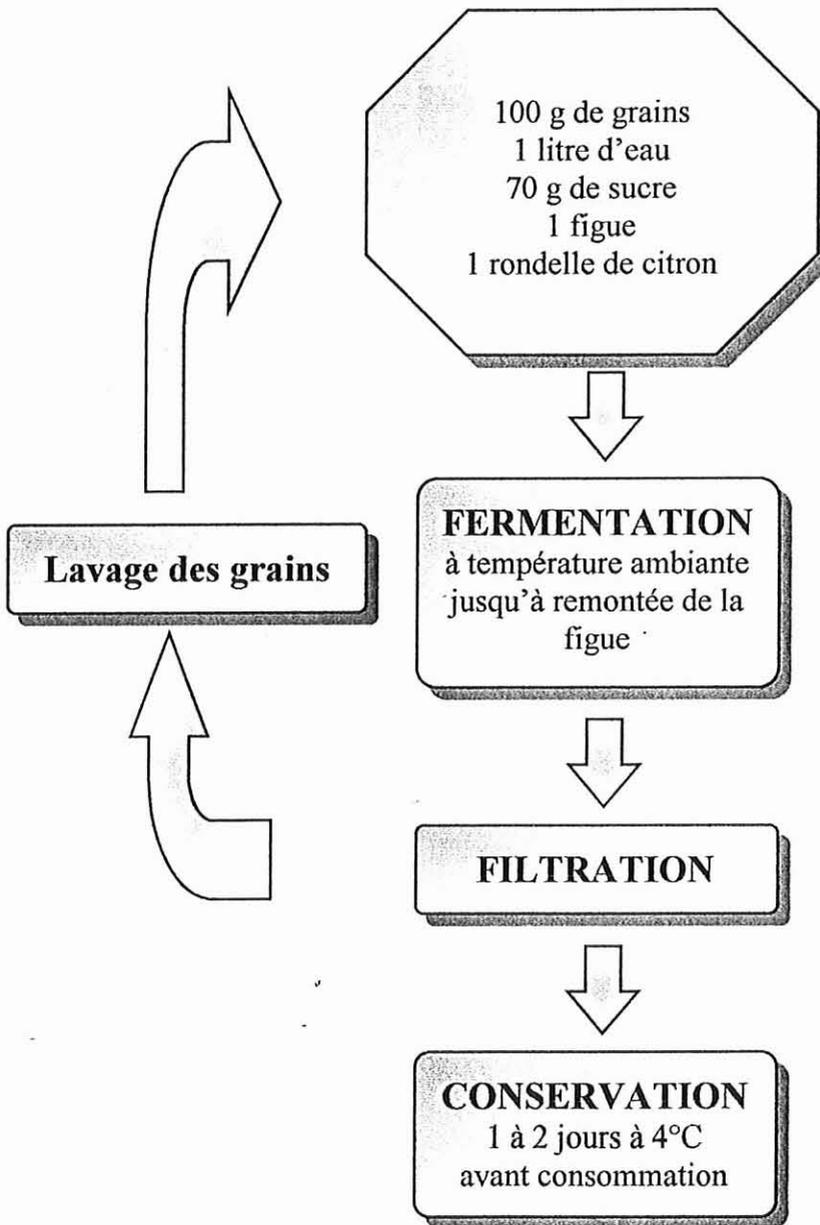
Le kéfir est reconnu comme boisson diététique puisqu'il est peu sucré, peu alcoolisé (< 1 %) et riche en acides organiques. Bien qu'aucun dosage n'ait été effectué, on peut supposer qu'il est enrichi en vitamines, principalement du groupe B, et en acides aminés du fait de la présence des levures. La boisson renferme des micro-organismes vivants (levures et bactéries lessivées du grain) dont les propriétés probiotiques ont fait l'objet de nombreuses études. Mais ce rôle est surtout accordé aux bactéries lactiques.

Certains auteurs soulignent le rôle probable des polysaccharides sur la stimulation du système immunitaire (18, 51).

Il existe d'autres boissons lactées résultant d'une double fermentation lactique et alcoolique, et connues sous les noms de : koumiss, continental acidophilus, taette, mazun, leben, kuban, buttermilk plant ou dahi (18).

Le « koumiss », originaire de l'ex Union Soviétique (ou « aïrag » en Mongolie), est préparé à partir de lait de chamelle. Là encore, la fermentation résulte de l'activité d'une flore complexe composée de bactéries et de levures (9).

Fig. 38 : Fabrication du kéfir sucré (18, 51)



3. PRODUITS CARNES FERMENTES

A la surface des boyaux de viande fermentée (saucisses) se développent de petits points blancs, la fleur, composée de cristaux de sel, de microcoques et de levures dont les plus représentatives sont *Candida deformans*, *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula rubra*... (9, 45). Plusieurs auteurs ont montré que le genre *Debaryomyces* prédominait (45).

Ces produits sont habituellement obtenus à partir de maigre et de gras de viande additionnés de sels, glucides et épices. Les viandes ne sont pas pasteurisées comme le lait et apportent donc une quantité considérable de micro-organismes, sauf si des techniques de décontamination sont appliquées (9).

Les levures trouvent un bon terrain de croissance car la viande comporte un fort pourcentage de molécules assimilables (protéines, sucres, nitrates), facteurs qui, en un certain sens, sélectionnent les espèces (45).

Elles sont sous dominantes par rapport aux bactéries et aux moisissures mais deviennent prépondérantes en surface sur le boyau (9).

Dans le but de supprimer les opérations de broyage puis de blanchiment artificiel, différentes microflore à base de levures ou moisissures sont commercialisées. L'ensemencement se fait par trempage juste avant embossage (9).

La société SOUSSANA DE THIAIS (94) commercialise 2 mélanges de levures, Prisca – PNT 1 et Florine, utilisés en tant que flore de surface sur les saucissons secs, c'est à dire pour empêcher le développement de moisissures vertes (24).

Cette même société commercialise des levures ferment (ELCE BR) utilisées pour améliorer la date limite de consommation et les caractères organoleptiques des saucisses fraîches (24).

Rôles des levures :

Elles :

- participent au séchage par leur action enzymatique
- développent l'arôme par leur action lipolytique et protéolytique
- évitent le rancissement en consommant l'oxygène
- évitent une saveur trop acide en dégradant l'acide lactique
- contribuent à la formation d'une pellicule blanche sur les saucissons (45).

PARTIE II

Chapitre V

AUTRES

APPLICATIONS

1. Production d'alcool industriel
2. Production de pigments

1. PRODUCTION D'ALCOOL INDUSTRIEL

30 milliards de litres de cet alcool, de plus en plus utilisé comme carburant alternatif aux hydrocarbures, sont aujourd'hui consommés annuellement à l'échelle mondiale. Il est produit à 80 % par fermentation anaérobie de différents sucres par *Saccharomyces cerevisiae*, levure aérobie facultative.

Au cours de cette fermentation, environ 4% du carbone consommé sont transformés en glycérol et non en éthanol. On cherche donc à réduire cette quantité de glycérol pour considérablement augmenter la production d'alcool. Le gain se chiffrerait en milliards d'euros. Une équipe danoise est déjà parvenue à réduire la production de glycérol de 35 %. D'autres chercheurs ont par ailleurs mis au point des levures améliorées, capables notamment de produire de l'alcool à partir d'autres sucres que ceux utilisés par *S.cerevisiae*. Ceci ouvre de nouvelles voies pour l'utilisation de biomasse comme source alternative d'énergie (5).

1.1. SUBSTRATS

Plusieurs substrats peuvent servir de base à la culture de ces levures. Tous contiennent du saccharose : jus de betterave, sirop, égout ou mélasse de sucrerie, vinasses (52). Ce sont néanmoins les céréales qui sont les plus utilisées, après ajout d'amylases (64).

1.2. SELECTION DES SOUCHES

Pour être utilisées dans ce but, les levures sont sélectionnées comme suit :

- Génétiquement stables et performances égales sur un grand nombre de fermentations
- Fermentation la plus rapide possible et production d'éthanol la plus proche du rendement théorique
- La flaveur est sans importance mais la production de certains composés volatils réduit le rendement et complique la distillation
- Peu d'exigences en facteurs de croissance pour limiter les additions de vitamines
- Bonne tolérance à une pression osmotique élevée si la production a lieu sur recyclage de vinasse
- Bonne tolérance à l'éthanol, c'est à dire une bonne viabilité en fin de fermentation, pour les procédés avec recyclage de levures
- Eventuellement, la floculence (52).

2. PRODUCTION DE PIGMENTS

Certaines souches sont capables de produire des pigments type mélanine (*Aureobasidium pullulans*), des caroténoïdes (genres *Rhodotorula* et *Phaffia*) ou de la pulcherrimine (*Metschnikowia pulcherrima* et certaines espèces de *Kluyveromyces*) (10). Toutefois, les levures sont le plus souvent non pigmentées

Il est possible, en modifiant génétiquement la levure rouge *Xanthophyllomyces dendrorhous*, de lui faire produire d'importantes quantités d'astaxanthine, pigment naturel commandant l'expression de la couleur des poissons et des crustacés, ainsi que des plumes d'oiseaux. *Phaffia rhodozyma* en produit aussi.

Les industries alimentaires utilisent ce pigment pour la coloration de truites, saumons, homards, ainsi que le jaune d'œuf de poule. Toutefois, pour avoir le meilleur résultat, les cellules de levure doivent être introduites intactes dans le milieu à colorer. Leur membrane cellulaire et leur paroi, résistantes, seront dégradés dans un second temps par action mécanique. Parfois, les cellules sont partiellement pré-digérées avant d'être introduites (64).

D'une manière générale, lorsque les cellules entières sont introduites, la coloration est plus importante que lorsque le pigment, seul, est injecté (64).

Actuellement, les industries emploient de l'astaxanthine synthétique, mais ce pigment pourrait bientôt être produit par biotechnologie (5).



CONCLUSION

Les levures présentent donc un large potentiel industriel, dans la préparation d'aliments et de boissons de consommation courante.

Leur emploi en tant que levure-aliment chez l'homme n'a pourtant pas connu un plein essor en raison du problème de l'apport d'acides nucléiques pouvant se révéler néfaste.

Aussi, lorsque se sont développées les levures cultivées sur hydrocarbures, les industriels se sont heurtés à une population scientifique très méfiante. Les embryons d'études de toxicité qui ont été menées n'ont pas abouti en raison de l'évolution du cours du pétrole par rapport à celui du soja.

Aujourd'hui, l'emploi de levures comme source de protéines dans l'alimentation humaine, bien qu'il soit tout à fait possible et inoffensif si les apports sont modérés (acides nucléiques), reste mineur et dépendant fortement des données économiques.

Par ailleurs, il serait intéressant de poursuivre les études de toxicité qui ont été menées. En effet, des scientifiques ont mis en évidence que la levure comportait dans son génome, un élément appelé PSI+, transmissible par voie cytoplasmique et présentant certaines propriétés analogues à celles des prions de mammifères, lesquels sont liés notamment à la «maladie des vaches folles». Les résultats obtenus chez la levure présentent une convergence remarquable avec ce que l'on sait déjà des prions, agents protéiques liés à des maladies neurologiques transmissibles à l'homme et l'animal (Cahiers «agricultures», Vol. 5, n°6, 435-44, 465-66, 11-12, 1996).

En dehors du fait que les levures fournissent un modèle expérimental idéal et devraient faciliter les recherches sur les prions, on peut se demander quel est l'impact de ces derniers lorsqu'ils sont intégrés à l'alimentation de l'homme ou de l'animal, notamment sous forme de levure aliment. Son ingestion journalière à doses pondérales présenterait-elle un risque à long terme ? Si l'emploi des levures avait été massif, en particulier dans les pays souffrant de dénutrition, aurions nous constaté l'émergence de nouvelles maladies telles que la Maladie de Creutzfeld Jacob suite à l'utilisation de farines animales ?

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ADRIAN J., FRANGNE R., POTUS J.
Les parois des levures alimentaires et leurs incidences nutritionnelles
Méd. et Nut., 1996, 32, 4, 167-170
- 2 AMOURI B., BONNET M., BOUISSEL C., ...
Veille scientifique et technologique : l'influence de la qualité du lait et des facteurs technologiques sur l'affinage des fromages
ENSAIA Nancy, 1994-1996.-20 p.
- 3 Anonyme
Annales du Symposium International (Mai 1995 ; Ecole Vétérinaire d'Alfort)
« Probiotiques – prébiotiques – parabiotiques »
Alfort, 1995, 143-151
- 4 Anonyme
Le pain : une bonne tranche de science
Eurêka, 1998, 28, 1-2
- 5 Anonyme
Usine cellulaire, division levures
RDT info, 1999, 20, 4, 6-8
- 6 Anonyme
Bringing back the flavour of fermented bread
Food manufacture, 1998, 76, 6, 23-24
- 7 Anonyme
« Congrès international (1996 ; Nancy) : Centenaire de l'Ecole de Brasserie de Nancy & 25 ans de l'ENSAIA »
Vandoeuvre les Nancy ; Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, 1996.-232 p.
- 8 BELLAM et FOULD SPRINGER
Levure et panification
Nathan Communication Paris, 1996.-73 p.
- 9 BOURGEOIS C.M., LARPENT J.-P.
Microbiologie alimentaire
Tome 2 : Aliments fermentés et fermentations alimentaires – 2^{ème} édition
Ed. Tec & Doc, 1996.-523 p.

- 10 BOURGEOIS C.M., MESCLE J.-F., ZUCCA J.
Microbiologie alimentaire
Tome 1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments – 2^{ème} édition
Ed. Tec & Doc, 1996.-672 p.
- 11 Brochure BIO SPRINGER : « Le monde des produits de levure »
- 12 Brochure des Brasseries Kronenbourg : « Une bière brassée avec savoir se déguste avec sagesse »
- 13 Brochure des Brasseurs de France, éditée par le Centre d'Information de la Bière
- 14 Brochure des entreprises FALA : « Société Industrielle FALA »
- 15 BUAMAH R., DZOGBEFIA V.P., OLDHAM J.H.
Pure yeast culture fermentation of cocoa (*Theobroma cacao L*) : effect on yield of sweatings and cocoa bean quality
World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1997, 13, 457-462
- 16 CHAMPAGNAT A., ADRIAN J.
Pétrole et protéines
Ed. Doin, 1974.-195 p.
- 17 CIANI M., MACARELLI F.
Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making
World journal of Microbiology & Biotechnology, 1998, 14, 199-203
- 18 DE ROISSART H., LUQUET F.M.
Bactéries lactiques : aspects fondamentaux et technologiques – Vol.2
Ed. Loriga, 1994.-614 p.
- 19 DEBRY G., MARTI C.
La bière
Revue de Nutrition Pratique, 1995, numéro spécial.-20 p.
- 20 DIVIES C.
Des levains pour les aliments fermentés
Bull. Soc. Fr. Microbio., 1996, 11, 2, 101-102
- 21 DONECHE B.
Les acquisitions récentes en microbiologie du vin. Incidences sur les propriétés organoleptiques et les altérations du vin
Ed. Tec & Doc, 1992.-146 p.
- 22 EARLY R.
The technology of dairy products – 2^{ème} édition
Ed. Thomson Science, 1998.-446 p.

- 23 FERREIRA FENNESY I.
Saccharomyces cerevisiae : importance dans le développement des sociétés humaines.
 Rôle dans l'industrie agro-alimentaire et en thérapeutique. -119 p.
 Thèse : Pharmacie : Paris XI : 1997
- 24 Fiche technique Soussana (94 – Thiais) : Prisca, Florine
- 25 Fiches techniques Bio Mérieux : Galeries d'identification API
- 26 FIESS M.
 A chaque produit ses ferments
 R.I.A., 1995, 547, 31-36
- 27 FOCESATO I.
 De la bière traditionnelle à la bière sans alcool.-174 p.
 Thèse : Pharmacie : Nancy : 1991 ; n°44
- 28 FREMY D., FREMY M.
 Quid 2000
 Ed. Robert Laffont, 1999.-2030 p.
- 29 FRIIS M.
 Swing – Rythm in ripening
 Scand.Dairy Inf., 1996, 10, 20-23
- 30 GALZY P., MOULIN G., ADRIAN J.
 Présence et utilisation des levures en alimentation humaine
 Ind. Alim. Agr., 1996, 9, 113, 656-662
- 31 GOURNIER-CHATEAU N., LARPENT J.-P, CASTELLANOS M.-I., LARPENT J.-L.
 Les probiotiques en alimentation animale et humaine
 Ed. Tec & Doc – Lavoisier, 1994.-192 p.
- 32 GRANDET J.
 Les levures-aliment
 Bull.Soc.Mycologique de France, 1989, 105, 4, 155-170
- 33 GU W.-L., AN G.-H, JOHNSON E.
 Ethanol increases carotenoid production in *Phaffia rhodozyma*
 Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1997, 19, 114-117
- 34 Guide des fournisseurs français d'ingrédients et d'additifs alimentaires
 R.I.A. supplément 1998
- 35 Guide des fournisseurs français d'ingrédients et d'additifs alimentaires
 R.I.A. supplément 1999
- 36 GUILLAUD S., HAGEN C., LEMOYNE C., ...
 Veille scientifique et technologique : la valorisation du lactosérum
 ENSAIA Nancy, 1995.-30 p.

- 37 GUINET R., GODON B.
La panification Française
Ed. Tec & Doc, 1994.-521 p.
- 38 GUIRAUD J.-P.
Microbiologie alimentaire
Ed. Dunod, 1998.-652 p.
- 39 HARDEN T.-J.
The reduction of bod and production of biomass from acid whey by *Kluyveromyces marxianus*
Food Australia, 1996, 48, 10, 456-457
- 40 HERMIER J., LENOIR J., WEBER F.
Les groupes microbiens d'intérêt laitier
Ed. CEPIL (Centre de Formation Permanente et de Perfectionnement des Cadres des Industries du lait), 1992.-568 p.
- 41 HESCLOT H., VLADESCU B.
La levure dans les industries alimentaires
Ed. Tec & Doc, Lavoisier, 1994.-56 p.
- 42 HIRTZ B.
La bière, sa fabrication et son incidence sur certaines variables biologiques- 150 p.
Thèse : Pharmacie : Nancy I : 1994 ; n°57
- 43 HOUPERT A., LEFEBVRE C., LYONNET H., ...
Veille scientifique et technologique : les probiotiques
ENSAIA Nancy, 1998.-36 p.
- 44 LARPENT J.-P.
Les ferments microbiens dans les industries agro-alimentaires (produits laitiers et carnés)
Ed. APRIA, 1991.-242 p.
- 45 LARPENT J.-P.
Biotechnologie des levures
Ed. Masson, 1991.-426 p.
- 46 LARPENT J.-P.
La microbiologie de la fermentation panaiere
Ed. APRIA/CDIUPA, 1992.-65 p.
- 47 LARPENT J.-P., LARPENT-GOURGAUD M.
Mémento technique de microbiologie – 2^{ème} édition
Ed. Tec & Doc, 1990.-417 p.
- 48 LARPENT J.-P., LARPENT-GOURGAUD M.
Mémento technique de microbiologie – 3^{ème} édition
Ed. Tec & Doc, 1997.-1039 p.

- 49 LEBLON C.
Etude des levures de vinification et des facteurs agissant sur la fermentation alcoolique.-
235 p.
Thèse : Pharmacie : Nancy I : 1988 ; n°51
- 50 LEJARD F.
Les présentations commerciales de ferments lactiques
Bul. Soc. Fr. Microbiol., 1996, 11, 2, 116-117
- 51 LEROI F.
Etude des interactions entre levures et bactéries isolées du grain de kéfir sucré – 220 p.
Thèse : Pharmacie : Nantes : 1993
- 52 LEVEAU J.-Y., BOUIX M.
Microbiologie industrielle : les micro-organismes d'intérêt industriel
Ed. Tec & Doc Lavoisier, 1993.-612 p.
- 53 MAGNET R
Contribution à l'étude de l'influence des micro-organismes sur la composition du rhum
– 259 p.
Thèse : Sciences : La Réunion : 1997 ; n° 571-1 MAG
- 54 MALFEITO-FERREIRA M., TARECO M., LOUREIRO V
Fatty acid profiling : a feasible typing system to trace yeast contamination in wine
bottling plants
International Journal of Food Microbiology, 1997, 38, 143-155
- 55 MANN E.
Whey processing and product. Part 1.
Dairy Ind. Int., 1994, 59, 12, 16-17
- 56 MICLO A.
Les levures dans l'alimentation. Micromycètes : auxiliaires de la production alimentaire
Conférence tenue le 5/10/99 – MJC Pichon – Nancy
- 57 MOLL M.
Bières alcoolisées à faible teneur ou sans alcool & coolers
Ed. Tec & Doc Lavoisier, 1991.-515 p.
- 58 PEARD C.
Champignons et protéines d'organismes uni cellulaires – 116 p.
Thèse : Pharmacie : Nancy I : 1985 ; n°70
- 59 PERENNOU H.
Chez les fournisseurs de ferments, le direct s'affirme
R.L.F., 1997, 570, 23-24
- 60 PIET SLUIMER I.
Le rôle de la levure dans la fabrication du pain
Industries des céréales, 1998, 109, 25-30

- 61 PRESCOTT, HARTLEY, KLEIN
Microbiologie – 2nde édition
Ed. De Boeck-Wesmael SA, 1995.-1014 p.
- 62 REGNAULT J.P.
Microbiologie générale – Vol. 1
Ed. Vigot, 1990.-859 p.
- 63 RENARD A.C., LEMOINE R.
Ferments d'aromatation : une demande croissante
R.L.F., 1989, 589, 22-23
- 64 ROSE A.H., HARRISON J.S.
The yeasts – 2nd edition – Vol. 5
Ed. Academic Press : Harcourt Brace & Compagny, Publishers, 1993.- 620 p.
- 65 SCRIBAN R.
Les Industries Agricoles Alimentaires
Ed. Tec & Doc, 1988.-382 p.
- 66 Site Internet
<http://www.ensem.u-nancy.fr>
- 67 Site Internet : Bière Mag
<http://www.bieremag.ca/brassage/fermentation.html>
- 68 Site Internet : Brasseurs de France
<http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/biere/hist.html>
- 69 Site Internet : champagnes Jacquart
<http://www.jacquart-champagne.fr>
- 70 Site Internet : fabrique de saké Izumibashi
<http://www.sphere.ad.jp>
- 71 Site Internet : les prions
<http://www.aupelf-uref.org>
- 72 Site Internet : les probiotiques en alimentation animale
<http://www.john-libbey-eurotext.fr>
- 73 SPENCER J.F.T., SPENCER D.M.
Yeast technology
Ed. Springer-Verlag, 1990.-407 p.
- 74 Syndicat des producteurs de levure-aliment de France
Les levures-aliment
Paris, 1991.-24 p.

- 75 TCHANGO TCHANGO J.
Qualité microbiologique des jus et nectars de fruits exotiques. Croissance et thermorésistance des levures d'altération, -217 p.
Thèse : Sciences : Lille : 1996 ; n° 50376-1996-25
- 76 VRIGNAUD Y.
Les levures-aliment : matière première et actions biologiques
R.A.A., 1991, 444, 71-73

DEMANDE D'IMPRIMATUR

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Stéphanie HENCKE

Sujet :

Utilisation alimentaire des levures

Jury :

Président : Mlle HINZELIN, Maître de Conférences

Juges : M. BAGREL, Professeur
M. LECTARD, Professeur
M. MICLO, Professeur

Vu,

Nancy, le 18 mai 2000

Le Président de thèse,

F. HINZELIN
Maître de Conférences

Vu et approuvé,

Nancy, le 18 mai 2000

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,
Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 22 mai 2000

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy I



Claude BURLET

Utilisation alimentaire des levures

Thèse soutenue le **Vendredi 30 juin 2000**

Par **HENCKÉ Stéphanie**

RESUME :

Les propriétés des levures sont très largement convoitées depuis plusieurs siècles dans la préparation d'aliments et de boissons de consommation courante.

Après une présentation sommaire de la cellule, de son organisation, de sa composition et surtout de ses capacités métaboliques, nous envisagerons seul l'aspect positif des levures dans les industries agro-alimentaires.

Le premier point concernera le très vaste domaine des boissons alcoolisées.

Ensuite, nous aborderons l'aliment en tant que tel, soit parce que la levure intervient dans son élaboration, soit parce que sa composition en fait un aliment à part entière. Il sera également question de la fermentation d'aliments d'origine animale ou végétale.

Enfin, pour terminer, nous évoquerons brièvement deux secteurs d'application marginaux.

Force est de constater que la levure bénéficie déjà d'une très grande notoriété dans le domaine de l'alimentation humaine et animale. Néanmoins, des travaux de recherche se poursuivent pour en exploiter encore mieux les caractéristiques.

MOTS CLES :

LEVURE – FERMENTATION – ALCOOL – ALIMENT

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mle HINZELIN	Biologie végétale et pharmacognosie	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement
④ – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle