**Sujets de recherche 2023-2024 - UR BRALim**

1. **Création de levures brassicoles hybrides par *spore-to-spore mating* et/ou par *mass mating***

*S. cerevisiae var. diastaticus* peut être responsable de refermentation en bouteilles ou en canettes excessive, conduisant à l’explosion des contenants et donc à des pertes conséquentes pour le brasseur. Ces souches particulières possèdent le gène chimérique *STA1*, codant pour une enzyme excrétée, la glucoamylase, capable de dégrader l’amidon et certaines dextrines, prolongeant ainsi la fermentation. Afin d’éliminer cette caractéristique (caractère diastaticus) tout en conservant les propriétés sensorielles de la souche (profil aromatique fruité et phénolique), une des pistes est de la croiser à une levure *S. pastorianus* ou *S. cerevisiae*.

Les approches envisagées sont la conjugaison entre spores, la conjugaison rare et la fusion de protoplastes (seule cette technique a été étudiée à ce jour).

Les étapes du projet comprennent :

* L’évaluation de la possibilité de faire sporuler les souches *S. diastaticus* LS1009 (diploïde), *S. pastorianus* LS2018 (diploïde) et *S. cerevisiae* LS5003 (ploïdie pas encore connue)[[1]](#footnote-1) ;
* L’utilisation du *spore-to-spore* mating et du *mass mating* pour créer de nouveaux candidats hybrides diploïdes)[[2]](#footnote-2) ;
* La recherche de *STA1* par PCR chez les différents candidats ;
* Des essais de fermentation pour évaluer l’attribut aromatique et le degré de fermentation des candidats hybrides.

1. **Mise au point d’une recette de *ginger beer*, caractérisation du produit finiet évaluation de l’impact des microorganismes utilisés pour la fermentation**

La bière traditionnelle Ginger est obtenue par ajout de gingembre frais en macération après 1e fermentation3 ou fermentation directe d’un jus sucré additionné de gingembre frais. Le projet propose d’évaluer :

* D’évaluer la faisabilité d’une fermentation spontanée à partir des racines de gingembre comme alternative (caractérisation du microbiote des racines de gingembre)[[3]](#footnote-3)
* De réaliser des fermentations avec un consortium défini de levures/bactéries (ce qui implique la pasteurisation de la matière première, le gingembre)
* D’évaluer la possibilité d’obtenir des produits avec ou sans alcool 🡪 importance de la levure utilisée
* De définir la composition des ginger beers commerciales et les qualités nutritionnelles des boissons obtenues (pouvoir antioxydant3, propriétés antiinflammatoires[[4]](#footnote-4)).

1. **Fiabilisation de la fermentation du kombucha/kéfir de lactosérum et détermination de leurs propriétés ‘pro-santé’**

Le kombucha est une boisson rafraîchissante issue de la fermentation de thé sucré par une culture symbiotique de bactéries acétiques et de levures. Cette boisson est souvent mise en avant pour ses effets bénéfiques sur la santé : renforcement des fonctions intestinales, stimulation du système immunitaire, réduction des réactions inflammatoires, anti-cancéreux, …

Le lactosérum est un sous-produit de l’industrie laitière, obtenu par la coagulation de lait lors de la fabrication de fromage. La production de kéfir de lactosérum est une alternative pour la valorisation ce lactosérum excédentaire.[[5]](#footnote-5)

Pour les deux boissons, le but est d’établir une recette et de constituer un consortium de microorganismes standard pour une production reproductible. Les étapes pour atteindre cet objectif sont :

* Évaluer la reproductibilité du processus de fermentation et la qualité des produits fermentés en réalisant plusieurs essais de fermentation de manière indépendante avec des consortia définis
* Étudier l’impact de la composition des milieux de fermentations (thé et teneur en sucre pour le kombucha ; origine du lactosérum pour le kéfir) sur les propriétés physicochimiques des produits fermentés.
* Evaluer le rôle et l’impact du taux d’ensemencement des différents partenaires microbiens sur les boissons
* Évaluer les propriétés pro-santé (in vitro) : pouvoir antioxydant (teneur en polyphénols, test DPPH et DCFH-DA), détoxifiant (acide glucuronique et DSL), …

Une commercialisation de ces boissons nécessite des tests de laboratoire (et pilote) afin de déterminer les paramètres importants à contrôler pour une production optimale et reproductible.

1. **Extraction de molécules d’intérêt des levures excédentaires de brasserie, dans ce cadre du projet ValorBSY (Win4Collective)**

Il s’agit de valoriser un coproduit de la brasserie, la levure excédentaire (Brewer’s Spent Yeast, BSY). La valorisation proposée consiste d’une part à l’extraction à l’eau pressurisée de molécules d’intérêt à forte valeur ajoutée, des antioxydants, et d’autre part, à formuler des produits alimentaires (tels que des barres de céréales) profitant des propriétés nutritionnelles des résidus des cellules de levures.

Les étapes proposées sont :

* Extraction à l’eau pressurisée (réalisée par le partenaire du projet, le CELABOR) et comparaison avec l’extraction hydroalcoolique[[6]](#footnote-6), [[7]](#footnote-7)

*Les méthodes proposées pour la mesure du pouvoir antioxydant sont le test DPPH qui évalue la capacité d’un antioxydant à réduire le radical chimique DPPH° (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) par transfert d’un hydrogène, le test à l’acide thiobarbiturique (TBA) qui réagit avec les produits de l’oxydation et la mesure indirecte ou test ‘levure’ qui évalue les espèces réactives totales d’oxygène intracellulaires en utilisant le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate (DCFH-DA). Des antioxydants commerciaux seront utilisés comme référence (acide ascorbique, bi- ou méta-sulfite, érythorbate de sodium, catéchine…).*

* Filtration membranaire de l’extrait liquide
* Atomisation du filtrat
* Validation du potentiel antioxydant des extraits dans un processus industriel

Tests proposés :

*Test d'inhibition de la lipoxygénase : Les hydroperoxydes libérés par l’action de la lipoxygénase sur l’acide linoléique sont quantifiés par spectrométrie à 234nm. Le test permet de déterminer la constante d’inhibition apparente (Ki) et le pourcentage d’inhibition de l’antioxydant.*

*Test d’inhibition de la co-oxydation de la b-carotène : Les radicaux libres, issus de l’acide linoléique chauffé à 50°C, oxydent la b-carotène quantifiée par absorbance à 470nm.*

L’efficacité des antioxydants naturels de levure seront comparés à des antioxydants chimiques commerciaux (acide ascorbique, bi- ou méta-sulfite, érythorbate de sodium, catéchine, Brewtan®…).

1. **Influence de la levure sur l’expression aromatique des bières houblonnées**

Durant l’étape de houblonnage à cru, certains composés aromatiques du houblon comme le linalool, le myrcène et l’acide 3-méthylbutanoïque se solubilisent dans la bière ; alors que d’autres molécules (4-vinylsyringol, citronellol, b-damascénone, thiols polyfonctionnels …) sont libérées par l’interaction des levures avec les glycosides du houblon. Les activités enzymatiques associées à ces biotransformations sont les β-glucosidases et β-lyases. L'activité de la β-glucosidase entraîne la libération d'un terpène aromatique (et d'une molécule de glucose) à partir d'un terpényl glycoside non aromatique. Les terpènes peuvent avoir divers impacts aromatiques (agrumes, floraux) ; ils participent à l’intensité globale de l'arôme du houblon. L'activité de la β-lyase entraîne la libération de composés soufrés volatils appelés thiols, qui sont généralement associés à des arômes de fruits tropicaux, possédant des seuils de détection très bas. Le métabolisme des levures est complexe car les terpènes et thiols aromatiques libérés peuvent être ensuite transformés par la levure en d'autres composés avec des caractéristiques aromatiques différentes, augmentant la complexité de la bière finie.

L’objet de ce projet est d’évaluer l’impact de la levure, de son profil génétique, sur le développement aromatique des bières houblonnées. Il associe l’étude métabolique et la génétique de la levure à la caractérisation des COV, libérés par leur activité enzymatique. Différents genres de levure sont étudiés comme *Saccharomyces*, *Pichia* ou *Torulospora*.[[8]](#footnote-8),[[9]](#footnote-9)

1. **BeePNut**

Le projet BeePnut vise à collecter un ensemble de données sur les aspects nutritionnels potentiels des pollens entomophiles belges. En effet, pour appuyer l’hypothèse de l’intérêt de l’utilisation des pollens dans l’alimentation humaine, il est important de commencer par identifier et contrôler les éléments constitutifs des pollens. Pour ce faire nous avons mis en évidence les 5 axes d’analyses et de recherche :

* Identifier et quantifier les molécules présentant un intérêt nutritionnel évident,
* Identifier et quantifier celles pouvant être néfastes à la santé humaine,
* Vérifier leur variabilité en fonction des saisons,
* Déterminer l’impact de la zone de prélèvement (urbaine, péri-urbaine, rurale),
* Faire des pré-tests de stabilité à la conservation.

La liste non exhaustive des éléments à quantifier/caractériser comprend :

* Des facteurs nutritionnels : protéines, glucides, fibres, lipides, profils en acides aminés essentiels, vitamines A, B, C, E et K, facteurs antioxydants, probiotiques, …
* Des facteurs antinutritionnels : pesticides, métaux lourds, acide phytique, inhibiteur de la trypsine, lectine, saponine, …
* Les propriétés techno-fonctionnelles : solubilité, digestibilité in vitro, …

1. **Projet ORVALOC - Effet du terroir sur les variétés d’ORges brassicoles wallonnes dans le cadre de leur VAlorisation en circuit LOCal (en collaboration avec le Centre wallon de Recherches Agronomiques)**

La Région Wallonne a mis sur pied un plan de développement stratégique de l’orge brassicole sur 10 ans, entre 2017 et 2027 afin de soutenir et de développer tous les acteurs à chaque niveau de production de la filière (COLLEGE DES PRODUCTEURS, 2017). Cette initiative vise à satisfaire les attentes des petites brasseries locales et revitaliser la culture Wallonne d’orge brassicole.

L’objectif du travail proposé est de mettre en évidence un potentiel effet terroir de l’orge brassicole sur les flaveurs de la bière. Deux aspects sont à considérer :

* Etudier l’influence de la variété d’orge sur la flaveur de la bière (suivis annuels)
* Etudier l’influence des conditions phytotechniques, soit selon le mode cultural, conventionnel ou biologique, soit selon la date de semis de la culture d’orge, sur la flaveur de la bière.

Pour le suivi annuel, sept variétés d’orge dont les deux rangs d’hiver : Craft et Salamandre ; un six rangs d’hiver : Faro ; et les deux rangs de printemps : Planet, Fantex, Tosca et Accordine, que l’on sait propices à nos régions sont emblavées sur une même parcelle dans la région de Namur (Gembloux). Elles sont récoltées, stockées et maltées (malts de type Pilsen) dans les mêmes conditions afin de mettre en avant le facteur variétal. Une recette standardisée de brassage et de fermentation est mise en place pour caractériser les moûts et les bières obtenus.

Les résultats seront comparés à ceux obtenus en 2020, 2021 et 2022[[10]](#footnote-10).

Pour l’influence du mode de culture à savoir biologique versus conventionnel raisonné, 3 variétés sont considérées, Craft (2RH), Fantex et Planet en 2RP. Elles sont cultivées à Gembloux, sur des parcelles proches mais bien différenciées dans leur gestion culturale.

En plus des analyses physico-chimiques (humidité, protéine, calibre, taux d’alcool, rendement d’extrait, amertume, etc.) classiques basées sur les protocoles recommandés par l’EBC (European Brewery Convention) réalisées à chaque étape, une analyse sensorielle (avec traitements statistiques) poussée des moûts et des bières obtenus est effectuée par un panel d’experts.

1. **Caractérisation des chocolats par la technique de l’infra-rouge proche (NIR)**

Le chocolat est une suspension composée de particules non grasses (particules solides de sucre et cacao et éventuellement de particules de lait en poudre) dispersées dans une phase continue de beurre de cacao. Sa qualité est fortement influencée par la teneur de quatre composants à savoir les matières grasses, les protéines, le sucre et l'eau. Ces éléments contribuent à la sensation en bouche, à la fonte et à la libération des arômes.

Les autres critères couramment évalués sur le chocolat sont la distribution de la taille des particules, la viscosité dynamique et le polymorphisme et les transitions de phase du beurre de cacao (calorimétrie différentielle à balayage (DSC)). Toutes ces analyses permettent de prédirent la texture, la saveur du produit final et sa résistance à la chaleur, sa stabilité au stockage. Elles s’accompagnent d’une analyse sensorielle. Unique méthode pour évaluer les qualités organoleptiques d’un produit, elle nécessite le recrutement d’un panel et sa formation afin d’être utilisé comme outil de mesure.

Les méthodes actuelles pour tester les paramètres d'intérêt dans le cacao et le chocolat sont coûteuses, laborieuses et prennent du temps, en particulier lorsqu'elles sont mises en œuvre dans le cadre d'un processus. Le contrôle en ligne n'est pas pratique et parfois impossible. Il existe un besoin de surveillance rapide, rentable et en temps réel des paramètres à tous les stades du processus de fabrication du cacao et du chocolat. La spectroscopie NIR est l'une des méthodes qui a été examinée[[11]](#footnote-11).

Cette technique est basée sur l’absorption de la lumière par la matière organique présente dans les échantillons (spectre lumineux : entre 800 et 2500 nm). Elle nécessite une phase de calibration qui permet de lier le spectre infrarouge obtenu avec les résultats des analyses physico-chimiques et sensorielles.

Ce travail propose de collecter des résultats des analyses physico-chimiques et sensoriels et de les relier à l’analyse NIR. Il s‘effectue en partenariat avec la société Godiva.

1. Neiman (2011) Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 189 737-765. [↑](#footnote-ref-1)
2. Steensels *et al*. (2014) Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity,

   *FEMS Microbiol Rev* 38 947-995. [↑](#footnote-ref-2)
3. Pujiati (2021) The quality test of fermented ginger drink (ginger ale) produced from various types of Indonesian Ginger, *Proceedings of the 2nd International Conference on Education and Technology.* [↑](#footnote-ref-3)
4. Nutakor *et al*. (2020) Ginger beer: an overview of health benefits and recent developments, *Fermentations 102* [↑](#footnote-ref-4)
5. Londero et al. (2012) Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. Journal of Dairy Research 79 262–271. [↑](#footnote-ref-5)
6. Bastin, P., Van Nedervelde, L., Dillemans, M., Boivin, P. and Debourg, A. Evaluation of the potent antioxidant effect of Saccharomyces cerevisiae extracts during beer production. Cerevisia: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology, 27(1):27-32, 2002. [↑](#footnote-ref-6)
7. Bonifácio-Lopes T., José A. Teixeira & Manuela Pintado (2019): Current extraction techniques towards bioactive compounds from brewer’s spent grain – A review, Critical. Reviews in Food Science and Nutrition. [↑](#footnote-ref-7)
8. Tofalo et al. (2020) Correlation between IRC7 gene expression and 4-mercapto 4-methylpentan-2-one production in Saccharomyces cerevisiae strains. Yeast [↑](#footnote-ref-8)
9. Ruiz et al. (2021) New insights into the paradoxical distribution of IRC7 in Saccharomyces cerevisiae and its associated phenotypic and genomic landscapes. Environmental microbiology [↑](#footnote-ref-9)
10. Travail de fin d’études présenté par Kevin DJUITCHOKO EBOU en vue de l’obtention du grade académique

    de Master en Sciences de l’ingénieur industriel en agronomie (2023) [↑](#footnote-ref-10)
11. Alves Santos et al. (2021) NIR and MIR spectroscopy for quick detection of the adulteration of cocoa content in chocolates Food Chemistry, 349, 129095 [↑](#footnote-ref-11)