

## (12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 50053 A1**
- (43) Date de publication : **31.12.2021**
- (51) Cl. internationale : **A21D 2/14; A21D 8/04; C12N 1/18; C12N 15/01; C12R 1/865**
- 
- (21) N° Dépôt : **50053**
- (22) Date de Dépôt : **12.06.2020**
- (71) Demandeur(s) : **Université Sidi Mohamed Ben Abdellah , Route Imouizzer Fès BP 2626 , FES , 30000 (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **EL ABED Soumya ; IBNSOUDA Saad ; AOUINE Mouna ; HAGGOUD Abdelatif**
- (74) Mandataire : **IBNSOUDA SAAD**
- 
- (54) Titre : **Utilisation d'une levure non- boulangère pour la préparation des produits de boulangers légèrement sucrés**
- (57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'une levure non conventionnelle appartenant à l'espèce *Pichia kudriavzevii* pour préparer la pâte de boulangerie légèrement sucrée. L'invention porte aussi sur la tolérance aux conditions de stress par la dite souche.

**Titre : Utilisation d'une levure non- boulangère pour la préparation des produits de boulangers légèrement sucrés.**

**Abrégé :**

La présente invention concerne l'utilisation d'une levure non conventionnelle appartenant à l'espèce *Pichia kudriavzevii* pour préparer la pâte de boulangerie légèrement sucrée. L'invention porte aussi sur la tolérance aux conditions de stress par la dite souche.

## **Titre : Utilisation d'une levure non- boulangère pour la préparation des produits de boulangers légèrement sucrés.**

### **Description**

#### **Domaine technique**

La présente invention se rapporte au domaine de la panification, et concerne plus particulièrement l'utilisation d'une levure non- boulangère *Pichia kudriavzevii* pour la préparation de la pâte de boulangerie légèrement sucrée.

#### **Description de l'état de l'art antérieur**

Le document WO 2012/110711 divulgue des souches de *Saccharomyces cerevisiae* obtenues par procédé d'hybridation ou de mutation aptes à la production de levures de panification osmo-tolérantes et présentant une résistance intrinsèque aux acides organiques faibles.

Le document WO 96/38538 décrit des levures de boulangerie issues de souches de *Saccharomyces cerevisiae* améliorées présentant une osmo-tolérance importante en ce qu'elles produisent des dégagements gazeux intéressants dans des pâtes boulangères contenant de fortes concentrations de sucre.

De même, les documents FR 7739149, EP 0 008 554 et US 4.396.632 correspondent à des aspects différents de l'exploitation d'un procédé reproductible d'obtention par hybridation de nouvelles souches à large spectre.

Le point commun désavantageux de ces techniques de l'art antérieur est que les levures de boulangerie sont obtenues par voie génétique, trait que le consommateur d'aujourd'hui évite. Il existe dans la nature des souches de levures autre que *Saccharomyces cerevisiae* adaptées à la panification, par exemple le document WO 2013/156703 a proposé l'utilisation de levures non conventionnelles de *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis* pour la panification de produits de boulangerie ayant des notes aromatiques particulières.

La présente invention vise donc à exploiter une souche de levure non conventionnelle ayant une activité de fermentation comparable à celle de la levure de boulangerie tout en étant résistante à certaines conditions de stress.

#### **Exposé de l'invention**

Les produits de panification sont fortement importants dans notre société due à leur valeur culturelle et économique. La préparation de tels produits repose principalement sur l'ajout des agents de fermentation sous forme sèche, pressée ou liquide. *S. cerevisiae*, ou couramment

appelée levure de boulangerie, demeure la levure la plus domestiquée qui monopolise l'industrie de la boulangerie. Les principales fonctions de la levure de boulangerie dans le processus de panification sont (i) augmenter le volume de pâte par l'évolution du dioxyde de carbone lors de la fermentation des sucres simples, (ii) développer la structure et la texture de la pâte par l'effet d'étirement de l'expansion due à la production de gaz, et (iii) ajouter une saveur distinctive. Bien qu'il existe des levures de boulangerie adaptées aux différents types de pâtes : non sucrées, légèrement ou fortement sucrées. Les levuriers sont encore à la recherche de nouvelles souches de levures plus performantes notamment en termes de forces fermentatives et de résistance aux conditions de stress.

Dans ce cadre, notre invention repose sur l'utilisation de *Pichia kudriavzevii* comme seul agent de fermentation pour la préparation de la pâte de boulangerie légèrement sucrée, ainsi elle porte sur la résistance de la dite souche à certains conditions de stress.

### **Description des dessins**

La Figure 1 représente l'effet de NaCl (2%, 4% et 6%) sur la croissance de *Pichia kudriavzevii* et la levure de boulangerie.

La Figure 2 représente l'effet de saccharose (20%, 30%, 40% 50 % et 60 %) sur la croissance de *Pichia kudriavzevii* et la levure de boulangerie.

La Figure 3 représente l'effet de la haute température (35, 37, 42 et 45 ° C) sur la croissance de *Pichia .kudriavzevii* et la levure de boulangerie.

La Figure 4 représente l'expansion du volume de la pâte de boulangerie légèrement sucrée en fonction du temps.

### **Description détaillée de l'invention**

La présente invention porte sur la souche de levure *Pichia kudriavzevii*, déposée le auprès des Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes CCMM sous le numéro **CCMMP5**, qui présente une tolérance aux conditions de stress se traduisant par une :

- Résistance à des concentrations élevées en chlorure de sodium (NaCl) arrivant à 6 %.
- Résistance à des concentrations élevées en saccharose arrivant à 60 %.
- Résistance à des températures élevées arrivant à 45 °C.

Un autre volet de l'invention concerne l'utilisation de la levure *Pichia kudriavzevii* pour la préparation de pâte de boulangerie légèrement sucrée ayant un volume spécifique supérieur à 3 cm<sup>3</sup> /g.

La souche *Pichia kudriavzevii*, objet de cette invention a été isolée à partir des échantillons de levains naturels collectés de différentes localités de la région de Fès, Maroc, en février 2017. Les cellules de ladite souche ont été isolées sur la gélose extrait de levure peptone glucose

(YEPG) (10 g/l d'extrait de levure, 20 g/l de peptone, 20 g/l de glucose, 15 g/l of agar) supplémentée de chloramphénicol (100 µg/ml) en utilisant la méthode de dilution en série.

### **Tolérance aux conditions de stress**

Ce test a pour but d'évaluer la viabilité de *Pichia kudriavzevii* dans des conditions de stress telles que le sel, le sucre et la température. Il est nécessaire de vérifier la capacité de la levure destinée à la boulangerie à survivre à ces conditions car elles imitent le stress osmotique et thermique auquel la levure est confrontée durant la préparation et la cuisson des produits boulangers.

Pour ce faire, la souche *Pichia kudriavzevii* a été cultivé pendant 12 h dans 15 ml de YEPG liquide à 30 °C avec une agitation de 150 tr / min. Les cellules ont été récoltées par centrifugation, lavées avec de l'eau distillée stérile et ajustées à une densité cellulaire d'OD 600 nm 0,5. Des dilutions successives ont été effectuées et 0,1 ml de la dilution appropriée a été étalé soit sur YEPG agar additionné de NaCl (2%, 4% et 6%) pour tester la tolérance vis-à-vis le sel ou sur YEPG agar contenant le sucrose à différentes concentrations (20%, 30%, 40% 50 % et 60 %) au lieu du glucose. Pour le paramètre de la température, les cellules ont été cultivées sur gélose YEPG et incubées pendant 48 h à 35, 37, 42 et 45 ° C.

Les résultats illustrés dans la figure 1 ont montré que la souche *Pichia kudriavzevii* a été capable de croître en présence des concentrations élevées en NaCl arrivant à 6 %, alors que la croissance de la levure de boulangerie a été totalement inhibée à cette concentration.

En outre, les résultats de la figure 2 ont montré que les deux souches testées ont répondu différemment à l'augmentation des concentrations de saccharose. La souche *Pichia kudriavzevii* a présenté une meilleure tolérance par rapport à la levure de boulangerie avec un optimum de croissance à 40 %.

Enfin pour l'effet de la haute température, les résultats de la figure 3 ont montré que les deux souches ont pu se développer à 35, 37et 42 °C, mais seulement *Pichia kudriavzevii* a pu en résister à 45°C.

### **Pouvoir levain**

Pour réaliser ce test, la souche *Pichia kudriavzevii* a été tout d'abord cultivée pendant une nuit dans 100 ml de bouillon YEPG (10 g/l d'extrait de levure, 20 g/l de peptone, 20 g/l de glucose) à 30 ° C sous agitation à 150 tr / min. Les cellules de la levure ont été récoltées par centrifugation à 10 000 tr / min pendant 15 min, lavées deux fois avec de l'eau distillée stérile, puis filtrées

afin d'obtenir un gâteau de levure. Ensuite, les ingrédients suivants ont été mélangés manuellement pendant 15 min dans un récipient stérile : 100g de farine, 1.5 g de sel, 2 g de saccharose, 2g de levure et 67 ml d'eau distille stérile. Le mélange obtenu a été divisé en deux échantillons de 50 g et chacun a été transféré dans un cylindre gradué.

La fermentation a été laissée pendant 120 min à 30 ° C et le volume de la pâte a été mesuré toutes les 30 min. Le volume spécifique de pâte a été exprimé comme la différence entre le volume de pâte à la fin et au début de la fermentation par g de pâte. Pâte sans levure et pâte inoculée avec une levure de boulangerie pure ont été utilisé comme témoins.

La figure 4 représente les résultats de l'expansion de la pâte légèrement sucrée en cm<sup>3</sup>/g. La souche *Pichia kudriavzevii* a montré une bonne capacité de levage, même supérieure à celle de la levure de boulangerie pure dans la première demi-heure de fermentation.

*Pichia kudriavzevii* est maltose négative, mais elle consomme par ailleurs très bien les sucres simples disponibles dans la farine. Après une heure de fermentation à 30°C, les profils de gonflement des pâtes ont été changés avec une augmentation légère du volume de la pâte préparé avec la levure de boulangerie, alors que celle préparé avec *Pichia kudriavzevii* a gardé le même volume d'expansion.

Le volume spécifique maximal pour la levure *Pichia kudriavzevii* était de l'ordre de 3,7 cm<sup>3</sup>/g.

### **Application industrielle**

Selon l'invention la souche *Pichia. kudriavzevii* peut être utilisée dans le domaine de la panification pour la préparation des produits de boulangers légèrement sucrées.

### **Documents cités**

- WO2012/110711
- WO 96/38538
- FR 7739149
- EP 0 008 554
- US 4.396.632
- WO2013/156703

MA

50053A1

**Séquence de la souche**

**Code de la souche** : YSE 2

**Identification moléculaire** : *Pichia kudriavzevii*

**Accession** : LC389012

**Amorce ITS 4**

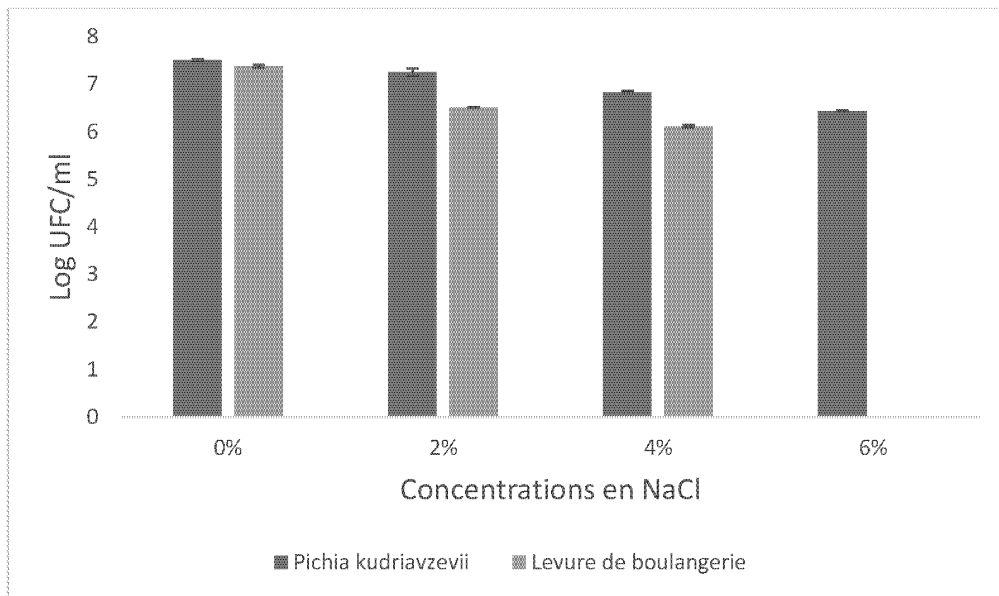
AGGCTGCTCTACCTGATTTGAGGTCGAGCTTTTTGTTGTCTCGCAACACTCGCTCTCGGCCGCCAAGC  
GTCCCTGAAAAAAGTCTAGTTCGCTCGGCCAGCTTCGCTCCCTTTCAGGCGAGTCGCAGCTCCGAC  
GCTCTTACACGTCGTCCGCTCCGCTCCCCAACTCTGCGCACGCGCAAGATGGAAACGACGCTCAAA  
CAGGCATGCCCCCGGAATGCCGAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAGAACTCGATGATTCACGATGGC  
TGCAATTCACACTAGGTATCGCATTTGCTGCGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCGTTGT  
TGAAAGTTTTGTTGTTTTTCGTAGATTTCTTTGTCGACTATATGCTATATTCCACATTTTAGGTGTTT  
TTGTTTTCGTTCGGTCACGCAATGGAGTACTAAATCACAGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTAC  
GGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCCCAAAGGGGAAAAAAA

**Revendications**

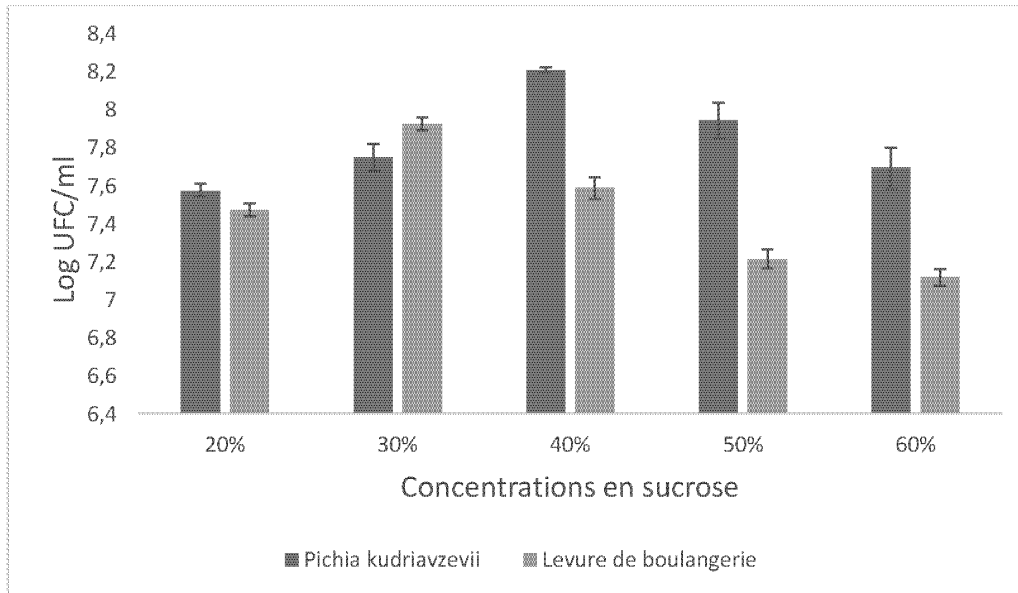
- 1 Souche de levure *Pichia kudriavzevii*, déposée auprès des Collections Coordonnées Marocaines de Micro-organismes CCMM sous le numéro **CCMMP5**
- 2 Souche de levure *Pichia kudriavzevii* selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est résistante à des concentrations élevées en NaCl arrivant à 6 %.
- 3 Souche de levure *Pichia kudriavzevii* selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est résistante à des concentrations élevées en saccharose arrivant à 60 %.
- 4 Souche de levure *Pichia kudriavzevii* selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est résistante à des températures élevées arrivant à 45 °C.
- 5 Préparation de pâte de boulangerie légèrement sucrée caractérisé par l'utilisation de la levure *Pichia kudriavzevii* selon l'une des revendications précédentes.
- 6 Pâte boulangère obtenue selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle présente un volume spécifique supérieure à 3 cm<sup>3</sup>/g.



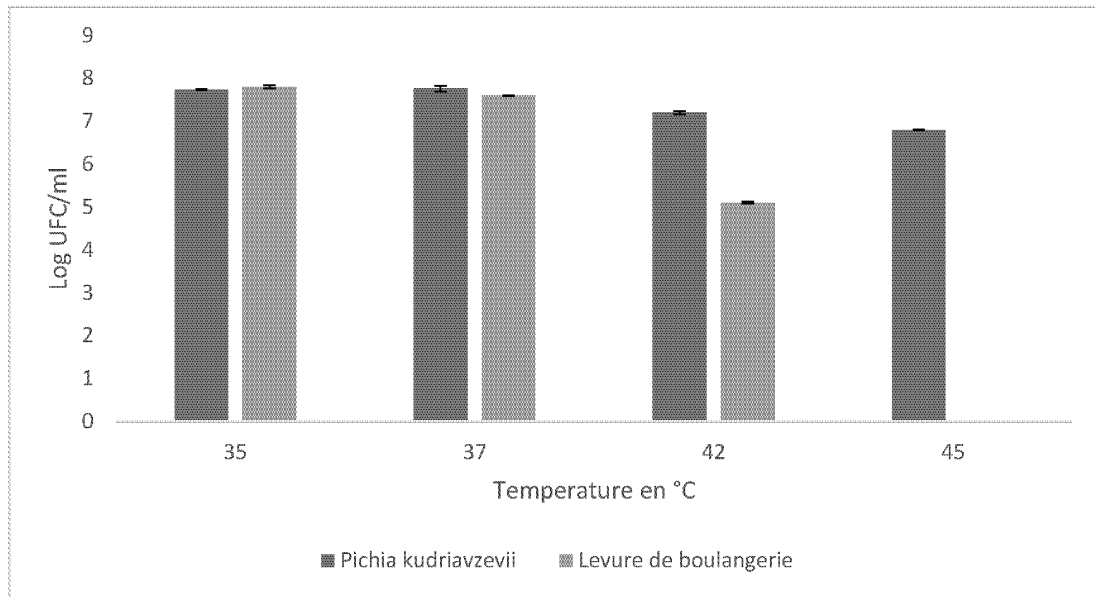
## Dessins



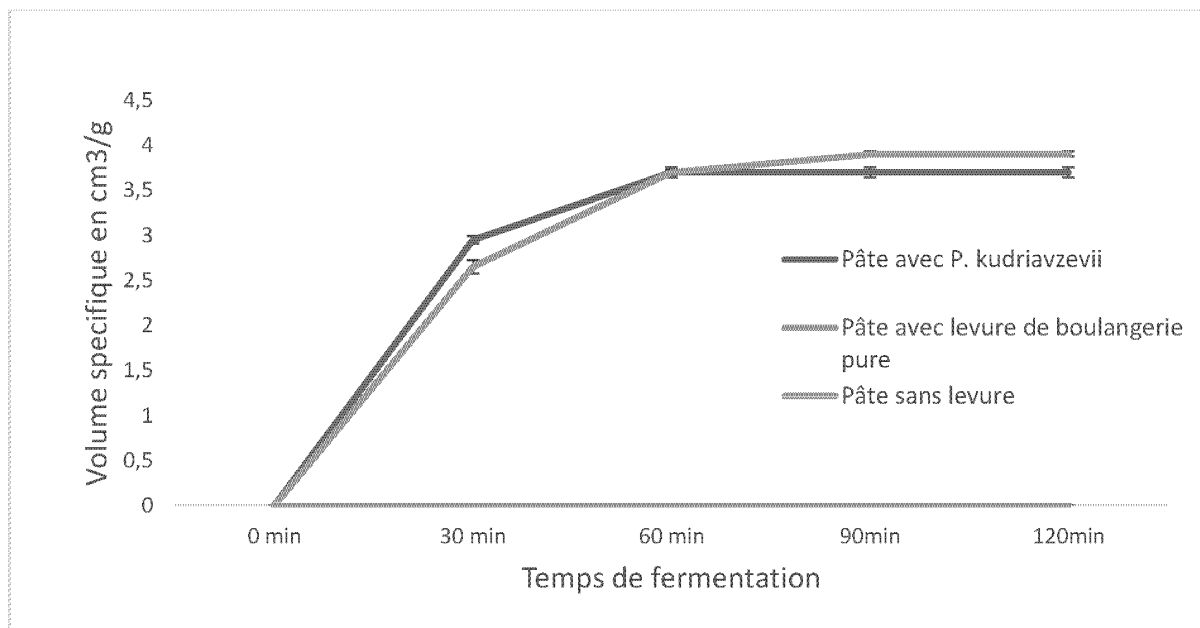
**Figure 1.** Représentation de l'effet de NaCl (2%, 4% et 6%) sur la croissance de *Pichia kudriavzevii* et la levure de boulangerie.



**Figure 2.** Représentation de l'effet de saccharose (20%, 30%, 40% 50 % et 60 %) sur la croissance de *Pichia kudriavzevii* et la levure de boulangerie.



**Figure 3.** Représentation de l'effet de la haute température (35, 37, 42 et 45 ° C) sur la croissance de *Pichia kudriavzevii* et la levure de boulangerie.



**Figure 4.** Représentation de l'expansion du volume de la pâte de boulangerie légèrement sucrée en fonction du temps.

**RAPPORT DE RECHERCHE  
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**  
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la  
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée  
par la loi 23-13)

<b>Renseignements relatifs à la demande</b>	
N° de la demande : 50053	Date de dépôt: 12/06/2020
Déposant : Université Sidi Mohamed Ben Abdellah	
<b>INTITULE DE L'INVENTION : UTILISATION D'UNE LEVURE NON- BOULANGERE POUR LA PREPARATION DES PRODUITS DE BOULANGERS LEGEREMENT SUCREES</b>	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents brevets cités dans le rapport de recherche sont téléchargeables à partir du site <a href="http://worldwide.espacenet.com">http://worldwide.espacenet.com</a> , et les documents non brevets sont joints au présent document, s'il y en a lieu.	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté	
<input type="checkbox"/> Cadre 5 : Défaut d'unité d'invention	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications exclues de la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<b>Examineur:</b> Redouane TELLAA	<b>Date d'établissement du rapport :</b> 20/01/2021
<b>Téléphone:</b> 212 5 22 58 64 14/00	



<b>Partie 1 : Considérations générales</b>		
<b>Cadre 1 : base du présent rapport</b>		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Description</u> 5</li> <li>• <u>Revendications</u> 6</li> <li>• <u>Planches de dessin</u> 2</li> </ul>		
<b>Partie 2 : Rapport de recherche</b>		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : A21D2/14; A21D8/04; C12N1/18; C12N15/01; C12R1/865		
CPC : A21D2/14; A21D8/04; C12N1/18; C12N15/01; C12R1/865		
Plateformes et bases de données électroniques de recherche :		
EPOQUENET, WPI, SCIENCEDIRECT, IEEE, ORBIT		
<b>Catégorie*</b>	<b>Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</b>	<b>N° des revendications visées</b>
A	LUCDE VUYST et al. YEAST DIVERSITY OF SOURDOUGHS AND ASSOCIATED METABOLIC PROPERTIES AND FUNCTIONALITIES; 19/12/2016	1 - 6
A	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/lc389012">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/lc389012</a> . Pichia kudriavzevii IFM 51993 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence GenBank: LC389012.1; 11/07/2018	1 - 6
A	CHUNSHENG LI et al; EFFECT OF INORGANIC SALT STRESS ON THE THERMOTOLERANCE AND ETHANOL PRODUCTION AT HIGH TEMPERATURE OF PICHIA KUDRIAVZEVII; 10/04/2018	1 - 6
A	LINA NUOBARIENE et al; ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYTASE-ACTIVE YEASTS FROM SOURDOUGHS AUTHOR LINKS OPEN OVERLAY PANEL; 05/05/2012	1 - 6
A	ANNAGREPPI et al; PHYTASE-PRODUCING CAPACITY OF YEASTS ISOLATED FROM TRADITIONAL AFRICAN FERMENTED FOOD PRODUCTS AND PHYPK GENE EXPRESSION OF PICHIA KUDRIAVZEVII STRAINS AUTHOR LINKS OPEN OVERLAY; 09/04/2015	1 - 6

A	JOHANNES DELGADO-OSPINA et al; FUNCTIONAL BIODIVERSITY OF YEASTS ISOLATED FROM COLOMBIAN FERMENTED AND DRY COCOA BEANS; 17/07/2020	1 - 6
<b>*Catégories spéciales de documents cités :</b>		
<p>-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		
<b>Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité</b>		
<b>Cadre 4 : Remarques de forme et de clarté</b>		
<p>a- L'objet des revendications 2-4 ne satisfait pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini. La revendication tente de définir l'objet par le résultat recherché, ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.</p> <p>b- Il ressort clairement la description que la caractéristique relative à la séquence de la souche <i>Pichia kudriavzevii</i> est essentielle à la définition de l'invention. La revendication indépendante 1 ne comporte pas cette caractéristique et ne satisfait donc pas à l'exigence de clarté, à savoir qu'une revendication indépendante doit contenir toutes les caractéristiques techniques essentielles à la définition de l'invention.</p>		
<b>Cadre 7 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle</b>		
Nouveauté	Revendications 1 - 6 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive	Revendications 1 - 6 Revendications aucune	Oui Non
Application Industrielle	Revendications 1 - 6 Revendications aucune	Oui Non
<p>Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure</p> <p>D1: ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYTASE-ACTIVE YEASTS FROM SOURDOUGHS AUTHOR LINKS OPEN OVERLAY PANELLINANUOBARIENEÅSE S.HANSENNILSARNEBORG</p>		

### 1. Nouveauté

Aucun document de l'état de la technique ne décrit une souche de levure de *Pichia kudriavzevii* telle que décrite dans la revendication 1 de la présente demande.

Par conséquent, l'objet de la revendication 1 de la présente demande est nouveau au sens de l'article 26 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

### 2. Activité inventive

Le document D1 est considéré comme l'état de la technique le plus proche de l'objet de la revendication 1 de la présente demande, il divulgue la diversité des levures des levains et leurs propriétés et fonctionnalités métaboliques associées, parmi les levures citées, on trouve *Pichia kudriavzevii*.

L'objet de la revendication 1 de la présente demande diffère de D1 par la souche de *Pichia kudriavzevii* utilisée.

Le problème que la présente demande se propose de résoudre peut être considéré comme la fourniture de levure alternative résistante aux conditions de stress pour la préparation de pâte boulangère.

La solution proposée dans la présente demande implique une activité inventive pour les raisons suivantes :

La souche CCMMP5 avec la séquence nucléotidique décrite dans la description n'est pas divulguée dans l'art antérieur, l'homme de métier n'arrivera pas à cette solution d'une manière évidente en partant des divulgations de l'état de la technique.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-6 implique une activité inventive au sens de l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13

### 3. Application industrielle

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible.