



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Amar Thelidji- Laghouat

FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : SCIENCES AGRONOMIQUES

MEMOIRE DE MASTER

Présenté par :

Ghezal Safia

DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE (SNV)

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

**La microflore des semoules de blé
fermentées traditionnellement (Sourdough)
bactéries lactiques et levures**

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mm Allali k	MAA	Président
Mr Goudjal Y	Professeur	Examineur
Mr Houicher A	MCA	Rapporteur

Promotion : Septembre – 2020

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار ثليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: غزال صفية

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

ميكروفلورا دقيق القمح المخمر التقليدي (الخميرة تقليدية): بكتيريا حمض اللاكتيك والخمائر

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيدة علالي خديجة	أستاذة مساعدة "ا"	رئيسا
السيد قوجال ياسين	أستاذ تعليم عالي	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	أستاذ محاضر "ا"	مقرا

الدفعة: سبتمبر – 2020

Nom et Prénom : Ghezal Safia.

Thème : La microflore des farines de blé fermentées traditionnellement (Sourdough) : bactéries lactiques et levures

Résumé

L'objectif principal de la présente étude est d'isoler et d'identifier partiellement des bactéries lactiques et des levures à partir de levain fermenté traditionnellement (Sourdough), afin de sélectionner des isolats pour étudier leur aptitude technologique. L'isolement a permis d'identifier partiellement 19 isolats de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus* spp. et 11 isolats de levures appartenant au genre *Saccharomyces* spp. L'étude de l'aspect sécuritaire des bactéries lactiques a montré que la majorité des lactobacilles isolés de levain fermentés traditionnellement présente une résistance à la Vancomycine (78%), la Chloromphenicol (68%) et l'Erythromycine (68%), et une sensibilité à l'Ampicilline (47%), la Pénicilline (31%) et la Tétracycline (31%). De plus, 8 (42%) isolats ont une gélatinase négative et 12 (63%) isolats de lactobacilles sont γ hémolytiques (absence d'hémolyse), tandis que 7(37%) isolats de lactobacilles sont partiellement hémolytique (α hémolyse). L'étude de l'aptitude technologique des levures a permis de déterminer que 7 isolats sont capables de croître à pH 4 dont l'isolat de *Saccharomyces* spp. S1Y2 semble être la plus résistante au pH acide. En outre, tous les isolats de levures sont capables de pousser dans un milieu à forte concentration d'éthanol (13%, v/v), où trois isolats de *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y9 et S1Y10 semblent être les plus résistantes à la forte concentration d'éthanol. À l'exception de 3 isolats, les levures testées ont également toléré la présence des sels biliaires (0.3% v/v). Le présent travail est une étude préliminaire pour la recherche des ferments lactiques et de levures à partir de levain fermenté traditionnellement (Sourdough), afin de sélectionner des isolats pour pouvoir être utilisés comme cultures starters en industrie des aliments fermentés et en panification.

Mots clés : Levain, Bactérie lactique, Levure, Aspect sécuritaire, Aptitude technologique, Laghouat

الاسم واللقب: صفية غزال.

العنوان : مكروفلورا دقيق القمح المخمر التقليدي (الخميرة تقليدية): بكتيريا حمض اللاكتيك وخمائر

الملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو عزل البكتيريا اللبنية والخمائر والتعرف عليها جزئياً من العجين المخمر التقليدي (العجين المخمر) ، من أجل اختيار السلالات لدراسة مدى ملاءمتها التكنولوجية. سمحت التحاليل الميكروبيولوجية بعزل والتعرف على 19 سلالة من البكتيريا اللبنية تنتمي الى نوع *Lactobacillus spp* و 11 سلالة من الخميرة تنتمي الى نوع *Saccharomyces spp* ، أظهرت دراسة جوانب السلامة لبكتيريا حمض اللاكتيك أن غالبية العصيات اللبنية المعزولة من العجين المخمر تقليدياً لديها مقاومة للفانكوميسين (78%) وللكلورومفينيكول (68%) وللإريثروميسين (68%) والحساسية للأمبيسيلين (47%) والبنسلين (31%) والتتراسيكلين (31%). بالإضافة إلى ذلك ، فإن 8 (42%) من البكتيريا اللبنية سالبة للجيلاتيناز و 12 (63%) من البكتيريا اللبنية γ hémolytiques لا تتسبب في انحلال الدم، بينما 7 (37%) من البكتيريا اللبنية تتسبب في انحلاله جزئياً α hémolytiques. حددت دراسات القدرات التكنولوجية للخمائر أن 7 من الخمائر المعزولة قادرة على النمو عند درجة الحموضة 4، مع ذكر أن *Saccharomyces spp* S1Y2 هو الأكثر مقاومة لدرجة الحموضة و بالنسبة لمقاومة الإيثانول فجميع الخمائر المعزولة الخميرة قادرة على النمو في وسط به تركيز عالٍ من الإيثانول (13%)، حيث توجد ثلاثة من الخمائر المعزولة S1Y3 و S1Y9 و S1Y10 هي الأكثر مقاومة للتركيز العالي من الإيثانول. من جانب اخر نجد أن جميع الخمائر التي تم اختبارها تحملت أيضاً وجود أملاح الصفراء (0.3%). هذا العمل عبارة عن دراسة أولية للعزل والتعرف على البكتيريا اللبنية والخميرة المتواجدة في العجين المخمر التقليدي (العجين المخمر)، من أجل اختيار السلالات لتكون قادرة على تحسينها و استخدامها في صناعة الأغذية المخمرة وفي صناعة الخبز.

الكلمات المفتاحية: العجين المخمر ، بكتيريا اللاكتيك ، الخميرة ، جانب الأمان ، الملاءمة التكنولوجية ، الأغواط.

First name : Ghezal .

Second name : Safia.

Theme : The microflora of traditional fermented wheat flour (sourdough): Lactic Acid Bacteria and yeasts

Summary

The main objective of this study is to isolate and partially identify lactic acid bacteria and yeasts from traditionally fermented sourdough (Sourdough), in order to select isolates to study their functional properties. Partially isolation identified 19 bacterial isolates belonging to the genus *Lactobacillus* spp., and 11 yeast isolates belong to the genus *Saccharomyces* spp. The study of the safety aspects of lactic acid bacteria has shown that the majority of lactobacilli isolated from traditionally fermented sourdough are resistant to Vancomycin (78%), Chloromphenicol (68%) and Erythromycin (68%), and sensitive to Ampicillin (47%), Penicillin (31%) and Tetracycline (31%). Additionally, 8 (42%) isolates are gelatinase negative and 12 (63%) lactobacilli isolates are γ hemolytic (no hemolysis), while 7 (37%) lactobacilli isolates are partially hemolytic (α hemolytic). The study of the functional properties of the yeasts determined that 7 isolates are capable of growing at pH 4, including the isolate of *Saccharomyces* spp. S1Y2 appears to be the most resistant to acidic pH. Moreover, all yeast isolates are able to grow in a medium with a high concentration of ethanol (13%, v / v), in which three isolates of *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y9 and S1Y10 appear to be the most resistant to the high concentration of ethanol. With the exception of 3 isolates, the yeasts tested also tolerated the presence of bile salts (0.3% v/v). The present work is a preliminary study for the research of Lactic acid bacteria and yeast from traditionally fermented sourdough (Sourdough), in order to select the candidates to be used as starter cultures in the fermented food and breadmaking industries.

Keywords: Sourdough, Lactic bacteria, Yeast, Safety aspect, Functional property, Laghouat

Dédicaces

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions. Je dédie ce travail à mes Parents qui m'ont permis de réaliser ce travail grâce à leur amour, leurs encouragements, leurs disponibilités, leur patience, leurs conseils qui m'ont été très précieux.

A mes sœurs

Amel, Zoubida, Roufida, Nacira

A mes frères

Bchir, Attallah, saif eddine

A mes chères amies

Lamia, Fatima, Bouchra et Iman

REMERCIEMENT

Au nom de dieu clément et miséricordieux, grâce à lui est faite pour avoir permis à notre peuple de recouvrir son existence à travers les nations et nous avoir guidé de l'obscur vers la luminescence.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de mémoire Dr. Houicher Abderrahman professeur à l'université Ammar thilidji Laghouat, pour sa patience, ses précieux conseils, la rigueur et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.

Je tiens à remercier Monsieur Goudjal Yacine et Madame Allali Khadija, mes professeurs à l'université de Laghouat pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de mémoire, d'examiner ce travail.

J'adresse également mes remerciements aux ingénieurs aux laboratoires en particulier Mr Ben chaoui Aissa et Mm Zahra Ranan.

Sommaire

Table des matières

Table des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Les aliments fermentés traditionnels

1. Fermentation et aliments fermentés	04
2. Levain de panification (Sourdough)	04
2.1. Historique	04
2.2. Levain naturel (Sourdough)	05
2.3. Etapes de fabrication de levain (Sourdough)	06
2.4. Différents types de levains (sourdough)	07
3. Facteurs influençant l'activité des levains de panification	09
4. Biodiversité microbienne des levains de panification	09

Chapitre II : Les microorganismes des levains de panification

1. Levures	11
1.1. Définition et historique	11
1.2. Classification des levures	11
1.3. Habitat	13
1.4. Caractéristiques morphologiques	13
1.5. Les besoins nutritifs	14
1.6. Quelques Méthodes d'identification des levures	14
1.7. L'aptitude technologique	15
2. Bactéries lactiques	16
2.1. Définition et historique	16
2.2. Classification	16
2.3. Habitat et origine	17
2.4. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques	17
2.5. Les Caractères culturaux	17
2.6. Les exigences nutritionnelles	18

Sommaire

2.7. Les Caractères biochimiques	18	
2.8 L'aspect sécuritaire.....	19	
Chapitre III : Intérêt technologique des levures et des bactéries lactiques		
1. Utilisation des levures dans les industries agro-alimentaires.....		22
1.1. Utilisation des levures dans la panification.....	22	
1.2. Utilisation des levures dans la production des boissons alcoolisées.....	22	
1.3. Utilisation des levures dans les industries des produits laitiers.....	23	
1.4. Autres applications.....	24	
1.5. L'intérêt des levures.....	24	
2. Utilisation des bactéries lactiques dans les industries agro-alimentaires.....		25
2.1. Bactéries lactiques dans les produits de panification.....	25	
2.2 Les bactéries lactiques dans les industries des produits laitiers.....	25	
2.3. Bactéries lactiques dans les boissons alcoolisées.....	25	
2.4. Les bactéries lactiques dans les produits carnés.....	26	
2.5. L'intérêt des bactéries lactiques.....	26	
Partie I : Etude expérimentale		
Matériel et méthode		28
I.1. Matières premières.....		28
I.2. Préparation du levain (Sourdough).....	28	
II. Isolement des flores du sourdough		28
II.1. Isolement des bactéries lactiques.....		29
2. Purification et conservation des bactéries lactiques.....	29	
3. Identification morphologique.....	29	
4. L'aspect sécuritaire.....	30	
II.2 Isolement des levures.....		31
3. Purification et conservation des levures.....	31	
4. Identification morphologique.....	32	
5. L'aptitude technologique.....	32	
Résultats et discussion		32
I. Sourdough (levain).....		33
II. Isolement des bactéries lactiques.....		33

Sommaire

1. Identification morphologique.....	34
2. Aspect sécuritaire des bactéries lactiques.....	35
III. Isolement des levures.....	41
1. Identification morphologique.....	41
1. L'aptitude technologique.....	42
Conclusion et perspectives	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N° 01 : Les différents types de levains.....	08
Tableau N° 02: Caractères morphologiques de quelques de bactéries lactiques isolées à partir de levain fermenté traditionnelle et cultivées sur milieu MRS.....	31
Tableau N° 03 : Valeurs critiques des diamètres des zones d’inhibition pour quelques bactéries Gram positif	35
Tableau N° 04 : Résultat du test antibiorésistance de bactéries lactiques sélectionnées pour cette étude.....	36
Tableau N° 05 : Résultat de la production de gélatinase et de l’activité hémolytique des bactéries lactiques sélectionnées pour cette étude.....	37
Tableau N° 06 : Caractères morphologiques de quelques isolats de levures isolées à partir de levain fermenté traditionnellement et cultivées sur milieu YPD-chloramphénicol.....	39
Tableau N° 07: Résultats de la résistance des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp. au pH acide, mesurée à la DO600 et exprimés en moyenne.....	41
Tableau N° 08 : Résultats de la résistance des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp. à l’éthanol (13%, v/v), mesurée à la DO600 et exprimés en moyenne.....	43
Tableau N° 09 : Résultats de la résistance des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp. aux sels biliaires, mesurée à la DO600 et exprimés en moyenne.....	45

LISTE DES FIGURES

Figure N° 01 : Division de cellules lévariennes par bourgeonnement	13
Figure N° 02 : Résultats de fermentation du Sourdough 1 (le premier échantillon additionné de la fève et le deuxième d'abricot) (Photo personnelle 2020).....	28
Figure N° 03 : Résultats de fermentation du Sourdough 2 (le premier échantillon additionné de la fève et le deuxième d'abricot) (Photo personnelle 2020).....	28
Figure N° 04 : Résultats de test de pouvoir d'antibiorésistance d'isolats (S1LAB8) (Photos personnelles 2020).....	33
Figure N° 05 : Résultats de test de pouvoir d'antibiorésistance d'isolats (S1LAB14). (Photos personnelles 2020).....	33
Figure N° 06 : Résultats de test de la production de la gélatinase des isolats S1LAB6 et S1LAB25 (Photos personnelles 2020).....	34
Figure N° 07 : Résultat de test de l'activité hémolytique d'isolats (S1LAB5). (Photos personnelles 2020).....	35
Figure N° 08 : Observation microscopique de l'isolat S2Y3 après la coloration de Lugol (G ×400) (Photos personnelles 2020).....	41

Liste des abréviations

FAO: Food and Agriculture Organization

ADN: Acide désoxyribonucléique

h: Heur

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

ssp: Sous espèce

UFC: Unité Formant Colonies

°C: Degré Celsius

MRS: Milieu de ManRogosa et Sharp

BHIB : Brain Heart Infusion Bouillon

YPD : Yeast Peptone Dextrose

Introduction

Introduction

Les céréales sont accompagnées l'évolution des civilisations humaines et constituent la base alimentaire de la majorité des populations du globe. Elles constituent un aliment fondamental, une source principale des calories alimentaires et une base commune de tous les régimes alimentaires. La consommation de céréales sous forme de produits dérivés (pain, farines, semoules...) constitue une part importante des dépenses alimentaires et dans certains cas, comme le blé, elles sont l'objet d'une première transformation en farine puis d'une utilisation dans des aliments après transformation par différentes technologies dont la fermentation (**Dridier et Prévost, 2009**). Au cours de la fermentation des céréales, des enzymes, des bactéries, des levures et des moisissures peuvent jouer un rôle seul ou en combinaison dans cette réaction (**Johnoson, 2000**), et parmi les différents produits fermentés on trouve la farine de blé fermenté traditionnellement qui est le levain. Le levain ou "sourdough" en anglais, "sauertieg" en allemand, "masa madre" en espagnol, "lieviti naturale" en italien, est une pâte acide composée d'une farine de blé ou de seigle et de l'eau soumise à une fermentation lente (24h à 78h) initiée par des levures et des bactéries lactiques (**Dridier et Prévost, 2009**).

La microflore du levain est composée d'associations stables de bactéries lactiques et de levures, notamment en raison d'interactions métaboliques. Ces associations microbiennes peuvent durer des années, bien que le processus de fermentation se déroule dans des conditions non aseptiques (**De Vuyst et Neysens, 2005**). Il est bien connu que les bactéries lactiques concourent à l'alimentation de l'humanité, elles jouent un rôle déterminant dans l'élaboration de nombreux produits fermentés, tels que les produits laitiers, les salaisons et la choucroute. Elles participent également à la production du pain, du café, du cacao, du vin et de l'ensilage. Les levures jouent également un rôle important dans le domaine de l'agro-alimentaire, ils sont largement utilisés dans la fabrication de nombreux produits alimentaires tels que le pain, la bière, le vin, et le saké (**Pol., 1996 ; Dridier et Prévost., 2009**).

Dans ce sens, notre étude est une investigation préliminaire effectuée sur la microflore des farines de blé fermentées traditionnellement (Sourdough), notamment des bactéries lactiques et des levures. Pour cela, les objectifs suivants ont été fixés:

- isoler et identifier partiellement les bactéries lactiques et les levures à partir de levain fermenté traditionnellement;
- Procéder à des tests sur l'aspect sécuritaire des bactéries lactiques qui comprend l'étude du pouvoir d'antibiorésistance, de l'activité hémolytique, et de la production de gélatinase;

Introduction

- et enfin, évaluer quelques aptitudes technologiques des levures isolées, notamment la résistance au pH acide (pH 4), à l'éthanol (13%) et aux sels biliaires (0.3%).

Cette étude est composée de deux parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les aliments fermentés, la microflore des levains de panification (bactérie lactique et levure), et l'intérêt technologique des levures et des bactéries lactiques. La seconde partie est intéressée au matériel et méthodes mises en œuvre pour réaliser ce travail, ensuite le traitement des différents résultats obtenus au cours de cette étude ainsi que leur discussion, et enfin nous achevons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I

1. Fermentation et aliments fermentés

La fermentation est considérée comme l'un des procédés le plus ancien et le plus économique pour la conservation des aliments, particulièrement dans les pays tropicaux où les fortes températures combinées aux niveaux élevés d'humidité favorisent la fermentation spontanée (Nout., 2009). Il peut y a voir une ou plusieurs étapes de fermentation allant de quelques heures à plusieurs mois selon l'aliment (Prückler et al., 2015).

Les aliments fermentés forment la base de l'alimentation dans de nombreux pays. Ils peuvent être obtenus à partir de matières premières aussi diverses que le lait, la viande, les céréales, les poissons, les fruits, les graines et tubercules pour donner une foule de produits qui vont des fromages aux charcuteries, en passant par les boissons, condiments ou pains de toutes sortes et cette liste étant loin d'être close (Montel et al., 2005).

Les aliments fermentés traditionnels sont très divers, même si l'on se limite au continent Africain, on constate que les matières premières sont également très variables et comprennent des céréales (blé, mil, maïs, riz, sorgho), des racines (manioc, taro), des légumes secs (haricot, pois chiche, graine de soja), mais également les graines de cacao ou les grains de café. Ils sont consommés sous forme de couscous, boissons, bouillies, soupes ...etc (Paul Ross et al., 2002; Carine et al., 2009).

2. Levain de panification (Sourdough)

2.1. Historique

C'est l'un des étapes le plus importante pour les produits de panification, son rôle est d'enrichir la pâte en dioxyde de carbone. Elle provoque une perte en matière totale (de l'ordre de 2 à 3%) par transformation des sucres en alcool et acide carbonique (Chargelegue et al., 1994). Le pain consiste la base de l'alimentation depuis sept à huit mille ans. C'était d'abord une galette plate, non fermentée, réalisée avec une bouillie de grains grossièrement broyés et cuit vrai semblablement sur des pierres plates chaudes (Valamoti., 2007).

C'est en Egypte dit-on qu'est apparu le 1^{er} pain fermenté. Lorsque l'on s'aperçut que la bouillie réalisée la veille produisait des bulles d'air et augmentait de volume, et que cette

bouillie réincorporée avec de la nouvelle farine donnait un pain plus léger de meilleur gout. Le pain au levain était né (**Valamoti., 2007**)

Rapidement les boulangers ont pris conscience de leur rôle dans la levée de la pâte. De manière empirique, ils ont cherché à augmenter la population de levures présentes dans la pâte finale. En effet, plus la population de levure est élevée plus la vitesse de développement de la pâte est rapide (**Bourgeois et Larpent., 1996**).

Les gaulois d'après Pline, réalisaient leur pain avec de la mousse de bière mais il faut attendre le XVII^e siècle pour retrouver trace de cet usage (**Bourgeois et Larpent., 1996**). Dans un premier temps la levure utilisée provenait de brasserie : on utilisait la levure de bière. Cet usage était fréquent dans les villes d'Europe dès le XVII^e siècle et se maintient jusque vers 1800. Les levures utilisées étaient de qualité inconstante et se conservaient mal (**Bourgeois et Larpent., 1996**).

D'un point de vue historique c'est de manière empirique que les levures de brasserie ou de distillerie ont été employées (**Bourgeois et Larpent., 1996**).

2.2. Levain naturel (Sourdough)

Selon **Montel et al. (2005)**, un levain naturel est une pâte formée de farine, d'eau et quelquefois de sel, qui subit une fermentation assurée par les micro-organismes présents dans la farine et par ceux qui proviennent de l'environnement du site de production. Il est entretenu par des rafraîchis successifs afin d'assurer le maintien du pouvoir fermentaire et le potentiel aromatique de levain (**Montel et al., 2005**).

Vogel et al. (1999) ont montré que le levain s'agit à la base, d'un mélange de farine de blé ou de seigle, du sel et de l'eau potable soumis à une fermentation lente (24 à 48 h) initiée par des levures et des bactéries lactiques contenues dans la farine (**Vogel et al., 1999**).

D'après **Fredot (2005)**, la fabrication de levain se fait à partir d'une petite quantité de pâte qu'est prélevée sur l'une des fournées du jour et laissée reposer plus de 12 heures en ajoutant régulièrement de la farine et de l'eau. Le gonflement de la pâte est assuré par la flore du levain constituée précisément d'un mélange de bactéries acidifiantes (lactiques et acétiques) et de levures (**Fredot., 2005**).

Donc, malgré que la fabrication de levain soit différent un peu d'un pays à l'autre mais il dépend du même principe (mélange des compositions qui subit une fermentation pendant spécifique temps) et de la même composition principale (farine, eau).

2.3. Etapes de fabrication de levain (Sourdough)

La fabrication de levain doit donc se faire en plusieurs étapes (jusqu'à 3 étapes). Chaque étape correspond à la confection d'un nouveau levain à partir d'une pâte (levain chef ou Chief sourdough, farine + eau) 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.

À chaque étape correspond, un enrichissement de la flore naturelle de la farine. Le levain est prêt quand la pâte lève spontanément, c'est-à-dire quand la quantité de levure sélectionnée par la fermentation naturelle est suffisante pour faire lever le pain (**Bourgeois et Larpent., 1996**).

La méthode « française » de fabrication des levains avec une température de développement de 20 à 25° C, plus favorable au caractère acétique de l'arôme, comprend deux phases :

- La première est une fermentation d'un mélange farine et d'eau à 50% d'hydratation pendant 24 à 48 heures puis rafraîchi, permettant de sélectionner et d'initier la croissance des germes indigènes,
- La seconde dure de 4 à 6 jours, comprend des étapes successives de fermentations rafraîchies, de 24 heures d'abord puis de 8 heures, jusqu'à l'obtention d'un pouvoir de pousse suffisant.

La méthode « Allemande » se différencie de la méthode française par :

- L'emploi de farine de seigle,

- Une hydratation et une température plus élevées qui favorisent le développement d'une acidité de type lactiques,
- La possibilité d'utiliser des starters (ferment commerciaux composés de bactéries associées ou non à des levures) pour initier la fermentation et une stimulation de la pousse par addition de levure boulangère (**Montel et al., 2005**).

2.4. Différents types de levains (sourdough)

Il existe différents types de levains ou préparations commerciales dénommées levain, utilisées en boulangerie artisanale et en boulangerie industrielle (Tableau 1).

L'utilisation de starters pour levains de panification est développée pour une utilisation au stade industriel ou artisanal. Cela permet de faciliter la préparation des levains mais a pour effet de standardiser les produits finis. On peut citer comme fournisseur de levains et starters de panification : Lesaffre (F), Lallemand (F et C), puratos (B), Bocker (D), ...etc. Les caractéristiques de souches utilisées dans la préparation de ces starters sont principalement leur potentiel acidifiant et aromatique, leur aptitude à résister au processus de séchage pour permettre des rendements de production et des reprises d'activité satisfaisants (**Dridier et Pévost, 2009**).

Tableau N° 01 : Les différents types de levains (Drider et Pévost, 2009)

	Levains traditionnel	Fermentation commerciaux			Levains déshydraté
		Levain liquide	Bactéries lactiques	Starters mixtes	
			Préparations sèches, concentrées		
Définition générale	Pâte liquide ou ferme, formée de farine et d'eau, ayant, après une succession de rafraîchis, une flore microbienne endogène « naturelle » active.	Préparation commerciale obtenu à l'aide de souches de bactéries lactiques sélectionnées.	Contient une ou plusieurs espèces de bactéries lactiques permet d'inoculer un mélange farine+eau pour une pré fermentation acide.	Contient plusieurs espèces de bactéries lactiques et levures sélectionnées Permet d'inoculer un mélange farine+eau pour obtenir un levain	Préparation commerciale obtenue par déshydratation de levain naturel ou élaboré par starters. Ajout comme ingrédient dans la pâte.
Contraintes	Nécessité d'une phase d'élaboration et de « rafraichis ». Risque de variabilité dans l'activité.	Achat, conservation à basse température.	Ajoute de levure dans la pâte. Conduite d'une préfermentation de 15h à 20h.	Conduite d'une préfermentation de 15h à 20h, en culture mixte.	Pas d'activité
Atouts	Typicité. Produit personnalisé, stable dans le temps si rigoureux dans conduite Appellation levain.	Praticité pré l'emploi Personnalisation possible. Stabilité plusieurs jours à 4°C.	Choix de souches possible. Monoculture plus facile à maîtriser que culture mixte.	Doit appellation levain.	Utilisation simple. Renforteur de goût et d'arômes. /Pas d'appellation levain.

3. Facteurs influençant l'activité des levains de panification

Différents facteurs endogènes et exogènes comme la température, le temps, et les ingrédients (la quantité de sel, la farine et ces caractéristiques, taux de cendres, et hydratation) qui influencent l'activité et le métabolisme de la flore microbienne des levains et donc les caractéristiques des pains (**Hammes et al., 1996; Vogel et al., 1996**). Différents travaux ont étudié les facteurs influençant l'activité des levains au stade d'élaboration, ou au stade de fermentation. *Lactobacillus sanfranciscensis* et *Candida milleri* ont déterminé les valeurs cardinales pour les principaux paramètres : température, pH, taux de sel, concentration en éthanol, en acide lactique et acétique (**Dridier et Prévost, 2009**).

4. Biodiversité microbienne des levains de panification

La microflore des céréales est composée de bactéries, levures et moisissures (10^4 - 10^7 UFC/g), leur nombre dans la farine est compris entre 2×10^4 et 6×10^6 UFC/g. Les bactéries sont principalement mésophiles se trouvent dans les levains spontanés fraîchement élaborés. Elles comprennent des bactéries aérobies Gram négatives (*Pseudomonas*) et anaérobies facultatives (*Enterobacteriaceae*), et également des bactéries Gram + comme les bactéries lactiques. Celles-ci comprennent des bacilles homofermentaires (*Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. plantarum* et *Lb. Salivarius*) et hétérofermentaires (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*), des cocci homofermentaires (*Ent. Faecalis*, *L. lactis*, *ped. Pentosaceus*, *ped. parvulus* et *ped. acidilactici*) et hétérofermentaires (*Leuco-nostoc* et *weissella*). Des bactéries pathogènes comme *S. aureus* et *B. Cereus* peuvent être présentes. (**Dridier et Hervé.,2009**)

Levain de panification comprend des levures qui assurent la fermentation, mais également une flore bactérienne variée au sein de laquelle les bactéries lactiques sont largement représentées (**Frederighi et al.,2005**).

Ces flores proviennent de la farine ou de l'air ambiant et du milieu de travail, et chacune ont un rôle particulier dans la pâte, résultat de son métabolisme (**Dridier et Hervé.,2009**), par exemple les levures qui fermentent le glucose pour produire le CO₂ nécessaire pour lever la pâte, et les bactéries lactiques qui fermentent le glucose et le fructose pour produire l'acide lactique, l'éthanol, l'acide acétique et le CO₂ (**Bourgeois et Larpent., 1996**).

Chapitre II

1. Levures

1. 1. Définition et historique

Les levures sont des champignons unicellulaires qui présentent une structure cellulaire eucaryote. Leur seule caractéristique commune est l'état unicellulaire bien que de nombreuses levures soient aussi capable de faire dans certaines conditions un pseudo-mycélium comme le genre *Brettanomyces*, voir un véritable mycélium comme *Candida albican* (Pol, 1996).

Les levures sont les premiers microorganismes à avoir été utilisés par l'homme puisque la production de boissons alcoolisées par fermentation est documentée dès 6000 ans avant notre ère chez les sumériens et les Babyloniens (Bouix et Leveau, 1991 et Pol, 1996). Elles sont également les premiers micro-organismes à avoir été observé au microscope par **A. Van Leeuwenhoek** qui les a dessinées vers 1680. Au XIXème siècle, c'est à la suite de ses travaux sur les levures que Pasteur contribua à la fondation de la microbiologie. Nul n'ignore ses succès et leurs retombées incalculables, particulièrement en termes de santé publique. A la même époque, la levure fut à l'origine du développement de la biochimie microbienne avec notamment les travaux Buchner (Pol, 1996).

1.2. Classification des levures

La classification des levures est naturellement une partie intégrante de celle des champignons. Elle est basée au moins au départ sur des caractères morphologiques mais fait intervenir de nombreux caractères biochimiques (Guiraud, 2003). La classification de référence est actuellement celle de Kreger-Van (1984) qui présente des changements sensibles par rapport à la précédente de Lodder (1971). En particulier, de nouveaux critères taxonomiques comme la composition en bases de l'ADN, la structure de la paroi, le type de coenzyme Q sont pris en compte pour permettre des études plus rigoureuses. La classification actuelle répertorie 60 genres et 500 espèces (Bouix et Leveau, 1991).

- **Les ascomycètes** : se reproduisent par un processus sexué dans un asque résultant de la transformation d'une cellule après méiose.
- **Les basidiomycètes** : réalisent une reproduction sexuée avec formation de basidiospores sur une baside.
- **Les deutéromycètes** : regroupent l'ensemble des levures ne présentent pas de mode connu de reproduction sexuée, ne se multipliant que par reproduction végétative.

1.3. Habitat

Les levures sont des espèces ubiquitaires et peuvent donc être existes dans divers éléments recueillis dans la nature (Pol., 1996). Elles se rencontrent sur les végétaux riches en sucre directement assimilables (Bouix et Leveau, 1991). Aussi les milieux fortement concentrés en sucre comme les sirops, le miel, les fleurs et de nombreux fruits, représentent un de leur environnement préférés (Leclerc, 1975 et Oteng-Gyang, 1984). On peut trouver les levures à la surface ou à l'intérieur d'autres êtres vivants, dans les eaux, dans l'atmosphère et dans le sol (Leveau et Bouix, 1993 ; Pol, 1996).

1.4. Caractéristiques morphologiques

Les levures sont des cellules eucaryotes arrondies, plus ou moins ovalaires, par exemple les genres *Saccharomyces* (Figure 2). Les *Schizosaccharomyces* ont des cellules de forme cylindrique, tandis que les *Brettanomyces* sont ogivales, plus ou moins allongées ou en forme de citron. Le grand axe a le plus souvent une longueur comprise entre 5 et 10 μm (Pol., 1996). Elles présentent une structure plus complexe que celle des bactéries notamment par la présence d'un noyau, de mitochondrie, d'un appareil de golgi et de plus d'un chromosome (Labrecque, 2003).

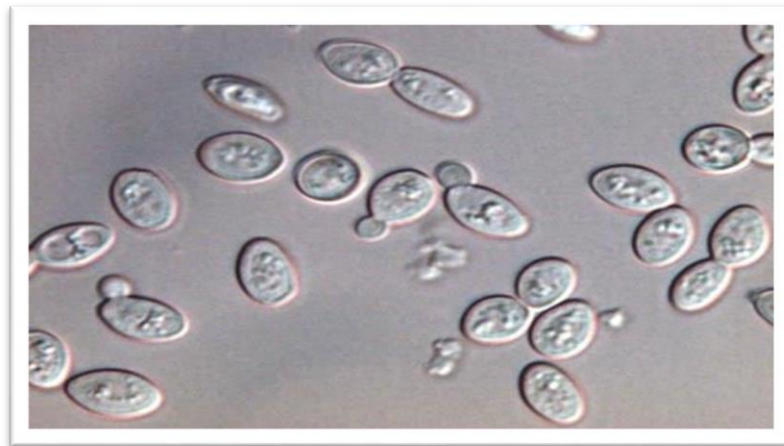


Figure N° 01 : Division de cellules levurienne par bourgeonnement (Leclerc et al., 1995).

1.5. Les besoins nutritifs

1.5.1. Sources de carbone

Le carbone est le composé majoritaire de la cellule levurienne et représente environ 50% du poids sec (**Rivière, 1970**), la plupart des levures utilisent des sucres comme source principale de carbone et par conséquent d'énergie. D'autres levures particulières utilisent des sources de carbone non conventionnelles (éthanol, glycérol) (**Barnett, 1976 ; Tamaki et Hama, 1982**).

1.5.2. Source d'azote

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote (telles que les sels d'ammonium ou de nitrate, la farine de soja, la peptone, les extraits de levures) dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (**Guiraud, 1998**).

1.5.3. Oligoéléments et facteurs de croissance

Les Oligoéléments sont des éléments constitutifs de coenzymes, présents en faible concentrations, variés et interviennent lors des réactions enzymatiques (**Larpen et Sanglier, 1992**). Ils augmentent la production de l'éthanol de 20% par *Saccharomyces cerevisiae* (**Guiraud, 1996**), ils jouent un rôle important dans l'activation et stabilisation des protéines et stimulent la croissance des levures (**Pommier, 2003**).

1.6. Quelques Méthodes d'identification des levures

1.6.1. Caractères cultureux

La détermination des caractères cultureux est effectuée par ensemencement des milieux de culture liquide (en tube) et solide (en tube gélosé incliné ou en boîte de pétri) et l'étude de la zone de la culture et l'aspect des colonies (milieu liquide : la forme, la couleur, milieu solide : la consistance des colonies) (**Guiraud, 1998**).

1.6.2. Caractères morphologiques et cellulaires

L'étude microscopique permet de définir les caractères morphologiques des cellules soit sphérique, ovoïde ou allongée, leur arrangement et le mode de reproduction végétative par scissiparité ou bourgeonnement (**Bouix et Leveau, 1991**). L'étude microscopique est

réalisée à l'aide des prélèvements à partir des cultures jeun en milieu liquide et/ou en milieu solide et effectuées entre lame et lamelle puis observer au grossissement x10 puis x40 (Joseph- Pierre et Guirod, 1998).

1.7 L'aptitude technologique

1.7.1 La résistance au pH acide

Les levures forment un groupe de microorganisme capable de croître à des environnements acides 1.5 à 3 à cause de leurs enveloppes cellulaires qui sont imperméables aux ions H_3O^+ et OH^- et par leurs métaboliques acidifiant encore plus le milieu, leur optimum pH varie entre 4.5 à 6.5, et leur favorable pH varie entre 7 et 8 (Delarras, 2014).

1.7.2 La résistance à l'éthanol

Le critère de choix de la sélection des souches de levures performantes se résume dans leur capacité à résister à des concentrations élevées en éthanol (Da Silva et al., 2013), la majorité des espèces de levures pouvaient croître dans un milieu contenant 10% et 13% (v/v) de concentration d'éthanol alors que seules quelques espèces de levures pouvaient croître dans 15% (v/v) éthanol telle que *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* a été bien cultivée dans un milieu contenant 15% de concentration d'éthanol, ce qui indique qu'ils tolèrent la toxicité de l'éthanol pendant la fermentation (Tsegaye et al., 2018).

Pour d'autres espèces, une forte concentration d'éthanol serait toxique pour la levure en inhibant la croissance cellulaire en raison de la destruction de la membrane cellulaire. Cela aurait pu expliquer l'inhibition de la croissance de la plupart des espèces de levures à une concentration de 15% (Tsegaye et al., 2018).

1.7.3 La résistance aux sels biliaries

La bile est un élément nécessaire du processus digestif, les acides biliaries, en tant que mélange de sels, de sodium taurocholique, glycocholique, désoxydant cholique, chénodésoxycholique et l'acide cholique sont une composition de la bile brute est sont sécrétés par la vésicule biliaire (Hung et Mekalanos, 2005). La tolérance biliaire des microorganismes est l'un des critères importants à considérer lors du choix d'une culture probiotique. Les micro-organismes résistants à la bile peuvent survivre et croître dans la teneur en bile des systèmes gastro-intestinaux, les levures *Saccharomyces cerevisiae*

pouvaient croître à une concentration biliaire de 0,3%, donc elles peuvent survivre et croître dans la teneur en bile des systèmes gastro-intestinaux (**Ozturk et Sagdic, 2014**).

2. Bactéries lactiques

2.1. Définition et historique

Les bactéries lactiques sont très ancien microorganisme dont les ancêtres auraient pu voir le jour trois milliard d'années. Elles sont apparues avant la cyanobactérie, et utiliser depuis 8000 ans dans l'alimentation humain, la plus ancienne iconographie sur la manipulation du lait de vache a été découvert on 1923 en Irak, il s'agit d'une mosaïque du temple de Nin-Khursag à Tell-Ell-Obeid sur la route d'Ur datée de 5 000 ans avant J-C (**Drider et Prévost, 2009**).

Ainsi, depuis la plus haute antiquité, les hommes ont produit du lait caillé fermenté, du fromage et du beurre. L'ensemencement en bactéries lactiques devait avoir lieu spontanément, car leurs récipients de récolte du lait : outres, jarres et autres contenants en terre cuite ou en bois (**Drider et Prévost, 2009**).

2.2. Classification

La classification des bactéries est basée sur la taxonomie polyphasique (**Colwell, 1970**), et la première classification établie en 1919 par **Orla-Jensen** est basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques (Figure 2).

Selon la taxonomie courante, le groupe de bactérie lactiques englobe 35 genres bactériens, les principaux genres sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Stile et Holsappel, 1997**) tous les principaux genres appartiennent aux même phylum, classe et ordre, seules les familles est les genres qui se différent, Phylum : *Firmicute*, classe : *Bacilli*, ordre : *Lactobacillales* (**Dortu et Thonrat, 2009**).

2.3. Habitat et origine

Les bactéries lactiques sont des microorganismes très anciens et très fréquentes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples tels que la viande, le yaourt, le beurre, le fromage. Elles se développent avec la levure dans le pain, le vin et la bière. Il existe des espèces qui colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux puisqu'elles sont des bactéries commensales naturellement associées aux muqueuses comme le petit intestin, le colon et le vagin (**Dridger et Prévost, 2009**).

2.4. Caractéristiques morphologiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont des cellules procaryotes organotrophes formant un groupe hétérogène (**Badis et al., 2005**). Elles sont des micro-organismes à Gram positive, immobiles, sporulés, anaérobies ou aérobies facultatives ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict et acido-tolérantes (**Salminen et al., 2004**).

2.5. Les Caractères culturels

Elles se développent majoritairement à pH 4,0–4,5 et certaines sont encore actives à des valeurs de pH extrêmes comme 9,6 ou 3,2, et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C. Elles possèdent des tolérances très variables vis-à-vis du NaCl et possèdent de faibles activités protéolytiques et lipolytiques. Le milieu le plus adapté pour la culture des lactobacilles c'est l'MRS, De Man, Rogosa et Sharpe, où les colonies se développent en 24 à 48 heures (**Caplice et Fitzgerald, 1999**).

2.6. Les exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, facteurs de croissance, peptides, bases puriques et pyrimidiques, les acides gras et les vitamines, telles que la pantothenate (B5), la cobalamine (B12) et la niacine (B3) (**Leveau et al., 1991**).

Le manganèse et le magnésium sont aussi nécessaires pour la croissance des bactéries lactiques, ils interviennent comme activateurs des réactions enzymatiques et comme stabilisateurs de la structure des acides nucléiques, de l'intégrité des ribosomes et de la membrane cellulaire des lactobacilles (**Leveau et al., 1991**).

2.7 Les Caractères biochimiques

Les lactobacilles sont catalase négative, certains ont une pseudocatalase, gélatinase négative et ils sont microaérophiles ou anaérobies. Le métabolisme énergétique des lactobacilles est exclusivement fermentaire, ils sont différenciés par leur type de fermentation des carbohydrates selon en trois groupes selon la classification de **Badis et al. (2005)** :

- **Groupe I des lactobacilles thermophiles et homofermentaires strictes**

Les isolats de ce groupe fermentent les hexoses en produisant exclusivement du lactate, mais ne fermentent pas les pentoses et le gluconate la plupart des espèces de ce groupe sont thermophiles (croissance à 45°C), dont *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* et *Lb. helveticus* (**Badis et al., 2005**) .

- **Groupe II des lactobacilles mésophiles et homofermentaires facultatifs**

Ce groupe rassemble des espèces dont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb sake* et *Lb. plantarum*, majoritairement mésophiles, fermentent les hexoses en produisant exclusivement du lactate et ne produisent pas du gaz à partir du glucose. Ils peuvent fermenter les pentoses (**Badis et al., 2005**).

- **Groupe III de lactobacilles mésophiles ou thermophiles et hétérofermentaires stricts**

Ce groupe rassemble des espèces relativement hétérogènes comme *Lb. brevis*, *Lb. kefir* et *Lb. sanfransisco*, fermentent les hexoses en lactate, en acétate et/ou en éthanol et CO₂ (**Badis et al., 2005**).

2.8 L'aspect sécuritaire

2.8.1 Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique. Ils agissent à faible dose pour inhiber la croissance des micro-organismes ou pour les détruire (**Mangin, 2016**).

La résistance bactérienne aux antibiotiques est due soit à des propriétés intrinsèques (traits phénotypiques naturels) soit par l'acquisition des gènes de résistance par le biais d'éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides et les transposons, soit par mutation des gènes indigènes. De telles propriétés acquises ou intrinsèques pourraient rendre le des bactéries capables d'inactiver rapidement des antibiotiques spécifiques par dégradation,

exportation des antibiotiques hors de la cellule par le système d'efflux, ou l'altération du site cible de l'antibiotique (**Adimpong et al., 2012**).

Jusqu'à présent, la plupart des études sur les antibiotiques bactériens ont porté principalement sur des isolats cliniques (microorganismes pathogènes) et les bactéries lactiques (**Adimpong et al., 2012**), la raison majeure pour laquelle les bactéries lactiques survivent en milieu hospitalier est la résistance intrinsèque à plusieurs antibiotiques couramment utilisés et peut-être plus important encore (**Sonbol et al., 2013**).

L'efficacité des antibiotiques apparaît dans sa capacité de diffuser le tissu bactérienne. Celle-ci réside dans sa capacité à pénétrer dans la bactérie et à se fixer sur sa cible afin d'en perturber le fonctionnement physiologique (**Mangin, 2016**).

Actuellement, la plupart des études cliniques disponibles ayant démontré un effet positif de la résistance aux antibiotiques des bactéries lactiques l'effet positif et lie aux probiotiques leur résistance aux antibiotiques joue un rôle importante sur la prévention et le traitement des diarrhées liées à la prise d'antibiotiques (**Sonbol et al 2013**).

2.8.2 La production de gélatinase

La gélatinase est un facteur de virulence sécrétée par la métalloprotéase Zn extracellulaire des bactéries lactiques, le gène codé de ce facteur c'est le gène (GelE), les analyses biochimiques du GelE purifié a montré qu'il clivait un certain nombre de substrats, y compris la chaîne insulinique, des fragments de collagène insolubles et principalement des hydrophobobaminoacides (**Waters et al., 2003**).

GelE a été initialement caractérisée il y a 40 ans, et s'est révélée être une métalloprotéase Zn, bien que l'enzyme n'ait pas été désignée GelE jusqu'à ce que son gène soit séquencé. Les métalloprotéases Zn des bactéries remplissent un large éventail de fonctions dans la biologie cellulaire normale et dans les infections microbiennes (**Waters et al., 2003**).

2.8.3 L'activité hémolytique

L'hémolyse c'est l'éclatement des globules rouges libérant l'hémoglobine dans le plasma sanguin, l'hémolyse c'est un facteur de virulence connu parmi les micro-organismes pathogènes **Maragkoudakis et al. (2006)**.

La recherche de l'activité hémolytique est l'une des exigences chez les bactéries lactiques, ce dernier a été effectué dans des différents travaux afin de confirmer leur sécurité,

les microorganismes probiotiques doivent être dénués de toutes formes de pathogénicité. L'absence d'activité hémolytique est considérée comme un pré-requis sûr pour la sélection de la souche probiotique (FAO/WHO, 2002). **Maragkoudakis et al 2006** ont été testé l'activité hémolytique des isolats des lactobacilles et ils montré peuvent être α hémolytiques (couleur verte autour des colonies) ; β hémolytiques (éclaircissement autour des colonies) ou γ hémolytiques (le milieu n'est pas modifié) (**Maragkoudakis et al 2006**).

Chapitre III

1. Utilisation des levures dans les industries agro-alimentaires

Les levures, par leur activité de fermentation assurent des caractéristiques bien particulières de texture et d'arôme, mais aussi une bonne sécurité alimentaire grâce aux acides organiques produits.

Les levures ont un rôle utile dans la fabrication de nombreux aliments liquides ou solide, dans la fabrication de protéines et dans d'autres applications agroalimentaires. Diverses levures dont *Saccharomyces cerevisiae* sont utilisées dans la fabrication du pain. Des souches de *Saccharomyces cerevisiae* sélectionnées sont impliquées dans la fabrication de boissons alcoolisées (vins, bières, cidres). Ainsi, des souches de *Candida*, *Torulopsis* et *Kluyveromyces* interviennent dans la fabrication de fromages à pâte pressée non cuite tels que le cantal et le laguiole dans lesquels elles sont majoritaires (Delarras, 2014).

1.1. Utilisation des levures dans la panification

Le pain levé serait apparu en Egypte antique avant d'être produit en Grèce, il y a environ 6 000 ans, puis dans le Nord/ Nord-Est de l'Europe (Hansson, 1994). L'utilisation d'écume de bière, afin de faire lever la pâte à pain, a été observée par Pline l'ancien (23-79 après JC) chez les Gaulois et les Ibères, alors que les Grecs et les Italiens, ne consommant pas de bière, utilisaient la farine de millet trempée dans du jus de raisin comme agent de fermentation (Rackham, 1967). En France en 1874 une nouvelle levure provenant de distillerie de grains a été utilisée pour la panification, avec des propriétés mieux que la levure de brasserie comme la qualité organoleptique et la conservation, cette levure a été vendue dans le marché et dite « la levure de boulangerie », puis en 1950, l'industrie a sélectionné et hybridé les souches de levures (souches de *S. cerevisiae*) afin de les rendre plus performantes et utilisé aux panification, aujourd'hui la plupart du pain que l'on consomme est préparé grâce à la fermentation à la levure "de boulangerie" (Roussel et Chiron, 2005).

1.2. Utilisation des levures dans la production des boissons alcoolisées

Les levures sont largement répandues dans le domaine alimentaire. Les utilisations traditionnelles, telles que le vin, le cidre, la bière, le saké et autres boissons alcoolisées, leur rôle est le plus important dans la fabrication des boissons alcoolisées. Cette fabrication repose sur la fermentation alcoolique qui consiste à transformer les sucres simples en alcool, transformant une molécule de glucose en deux molécules de CO₂ et deux molécules d'éthanol, ainsi qu'une production faible d'énergie sous forme d'ATP (Béguin et al., 2008).

La fermentation alcoolique du vin 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 souté pour atténuer certains défauts de fermentation. Diverses levures dont sont utiliser pour sécuriser les fermentations et marquer le jus de raisin sur des critères spécifiques, recherchés par le consommateur (arômes agréables, acidité moindre...) (**Bourgeois et Larpent 1996**).

Le cidre est une boisson de faible teneur en alcool (2 à 3°), Les levures trouver dans le cidre sont *G. kloeckera*, *S. ellipsoïdes*, *S. uvarum*. Ces levures sont celles retrouvées normalement sur les pommes. Une fermentation malolactique, qui est le fait de levures hétérofermentaires, est presque toujours observée (**Béguin et al., 2008**).

Saccharomyces cerevisiae est utilisée pour produire de la bière à haute fermentation (ale) alors que *Saccharomyces carlsbergensis* est utilisée pour produire de la bière à basse fermentation (lager). Les bières de fermentation basse doivent fermenter plus longtemps et à des températures plus basses que les bières de fermentation haute (**Bourgeois et Larpent 1996**).

1.3. Utilisation des levures dans les industries des produits laitiers

Les levures font partie de la flore normale du lait cru (environ 10^4 UFC/ml) et sont presque entièrement détruits par pasteurisation (**Hermier et al., 1992**). Elles sont présentes à tous les stades de la fabrication du fromage à raison de 10^6 et 10^8 cellules/g (**Larpent, 1991**), elles peuvent participer à la maturation des fromages par la fermentation du lactose, la consommation de l'acide lactique, la production de substances stimulantes et par leurs activités protéolytique, lipolytique et de production de composés d'arôme (**Nunez et al., 1981**).

Différent travaux a montrent que les levures présentent dans tous les stades de la maturation des fromages telle que la fromage Bleu et le fromage de Roquefort, Camembert, Gorgonzola et d'autres types de fromage (**Nunez et al., 1981**).

1.4. Autres applications

Par ailleurs, le pouvoir fermentaire de nombreuses levures est mis à profit dans l'industrie chimique, pharmaceutique pour la production de substances chimiques diverses et variées :

- Métabolites primaires indispensables au développement de l'organisme : acides aminés, acides organiques, alcools et solvants, lipides, bioénergie et biocarburant, polysaccharides, nucléotides, vitamines,
- Métabolites secondaires non nécessaires au développement de l'organisme : antibiotiques, arômes, produit pharmacologiquement actifs, substances de croissance végétales,
- Enzymes industrielles dont celles utilisées pour l'alimentation (**Delarras, 2014**).

Les levures sont largement utilisées dans divers secteurs de la recherche biomédicale et des biotechnologies. Ainsi, des levures génétiquement modifiées produisent l'antigène de surface du virus de l'hépatite B utilisé dans le vaccin anti-hépatite. D'autres produisent la sérum-albumine humaine (**Pol, 1996**).

A l'heure actuelle les levures constituant un matériel expérimental de choix en raison de leur double état de micro-organismes et d'eucaryotes et des centaines de laboratoires de recherche l'utilisent avec des objectifs variés (**Pol, 1996**).

2. Les bactéries lactiques dans les industries agro-alimentaires

L'utilisation de la fermentation par l'homme remonte à des temps très anciens. Les ferments lactiques, contenant une ou plusieurs cultures pures en proportions définies de différentes bactéries lactiques, sont largement utilisés en agroalimentaire (**Holzappel, 2002**).

2.1. Bactéries lactiques dans les produits de panification

Les attentes actuelles du consommateur pour les produits de boulangerie se concentrent sur les produits typés sensoriellement, qui ont une image de bienfaits naturels et pour la santé. Dans ce contexte, les potentialités des levains ouvrent des voies de recherche et d'applications par la valorisation des fonctionnalités (leur important rôle d'assimilation des sucres) des bactéries lactiques en panification afin d'améliorer les caractéristiques organoleptiques et satisfaisant les attentes des consommateurs (**Dridier et Prévost, 2009**).

2.2. Bactéries lactiques dans les industries des produits laitiers

Dans les produits laitiers, il s'agit du domaine d'application le plus courant des fermentations lactiques. Les ferments lactiques naturels ou commerciaux interviennent dans l'élaboration de tous les produits laitiers fermentés (**Pilet et al, 2005**). Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait, yaourt, fromage frais et affiné (**Desmazeaud, 1998**).

L'utilisation des bactéries lactiques dans la fabrication des fromages est considérée comme le moyen le plus fréquemment utilisé pour la conservation du lait, les trois genres les plus rencontrés dans les produits laitiers sont les streptocoques, les lactobacilles et les lactocoques. Ces trois genres microbiens et leur propriété identifiante (consommation des sucres, vitesse, quantité et la nature de l'acide lactique produit). Ces différences phénotypiques sont évidemment la clé du choix de leur utilisation pour chacun des types de fromages (**Delarras, 2014**).

2.3. Bactéries lactiques dans les boissons alcoolisées

Après le foulage, ou le pressurage du raisin, le jus de moût de raisin est naturellement contaminé par une microflore très diverse. La surface de la baie de raisin héberge de nombreuses espèces de moisissures filamenteuses, de levures et de bactéries, la population initiale bactérienne du raisin, composée à bactéries à Gram positif et à Gram négatif, aérobies et mésophiles, se limite rapidement aux bactéries lactiques et bactéries acétiques. Les

bactéries lactiques identifiées dans les moûts et les vins sont les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Oenococcus* (Delarras, 2014).

2.4. Les bactéries lactiques dans les produits carnés

Les produits carnés (viande fraîche et produit cru, cuits ou fermenté à base de la viande), sont des milieux de prédilection permettant le développement de différentes espèces bactériennes. La microflore des produits carnés dépend des manipulations post-abattage ainsi que de l'environnement des ateliers de transformation, parmi cette microflore on observe des bactéries lactiques. Ces derniers sont largement utilisés pour la fabrication de produits carnés fermentés. Elles jouent un rôle important dans le développement des qualités organoleptiques des produits et dans leur conservation en inhibant le développement d'espèces pathogène ou d'altération (Delarras, 2014).

2.5. L'intérêt des bactéries lactiques

- **Bioconservation**

La bioconservation consiste à ajouter sur un aliment un ou des microorganismes et/ ou leurs métabolites, sélectionnés pour leurs capacités à inhiber la croissance de microorganismes indésirables, dans le but d'augmenter la durée de conservation des denrées alimentaire et/ou de limiter la croissance de certains microorganismes pathogènes. Ce procédé s'inspire du concept traditionnel de fermentation où les microorganismes ont à la fois des activités de transformation organoleptique et de conservation (Delarras, 2014).

Les bactéries lactiques sont particulièrement de bons candidats pour les applications de la bioconservation, d'une part elles constituent souvent la flore majoritaire des produit réfrigérés conditionnés comme par exemple les pièces de viande cuites conservées sous vide, d'autre part elles possèdent des activités d'inhibition mettant en jeu des mécanismes variées: compétition nutritionnelle, production d'acides organiques, peroxyde de carbone, diacétyle, bactériocines. Enfin, elles sont reconnues comme GRAS (Generally Recognized As Safe) et sont souvent associées à l'image de produits traditionnels (Delarras, 2014).

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I.1 Matières premières

Dans cette étude, deux types de semoule de blé dure ont été utilisés pour la réalisation de ce travail. Ils ont été choisis selon leur disponibilité dans le marché de la ville de Laghouat. Le prélèvement a été effectué dans deux points de vente durant le mois de Septembre 2019. Les variétés sont d'origine inconnue et leur récolte est durant le mois Juin 2019 selon les vendeurs de la farine. La quantité ramenée au laboratoire d'analyse microbiologique, Département des Sciences Agronomiques, Université de Laghouat est de 2 Kg/type, conditionnés dans des sacs en papier.

I.2 Préparation du levain (Sourdough)

La formule de base pour la préparation du levain est la suivante (**Bourgeois et Larpent., 1996**) :

- Semoule ou farine (50 g).
- Eau physiologique stérile chauffée à 40°C (30 ml).
- Fruits, légumes sec (abricot/fève).

La préparation de levain chef (chief Sourdough) consiste à mélanger tous les ingrédients puis passer par un enrichissement de la flore naturelle de la farine selon le protocole suivant :

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.

Dans chaque étape d'enrichissement la quantité d'eau et de farine additionnée reste la même.

Tableau N° 02 : Les échantillons préparés du Sourdough fermenté traditionnelle.

Echantillons		
Sourdough 1	Sourdough 1 additionnée aux fèves	Sourdough 1 additionnée aux abricots
Sourdough 2	Sourdough 2 additionnée aux fèves	Sourdough 2 additionnée aux abricots

II. Isolement des flores du Sourdough

II.1. Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des lactobacilles est réalisé par la méthode décrite par (Aplevicz et al. 2014) avec des modifications mineures. Pour obtenir la solution mère, 10 g de chaque levain fermenté traditionnellement ont été mis dans 90 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisés pendant quelques minutes. A partir de cette culture mère (10^{-1}), une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-4}) est réalisée, où 0.1 ml de chaque dilution a été ensemencé dans les boîtes de Pétri en surface du milieu gélosé MRS sélective. Après 48-72 h d'incubation à 30°C, les colonies présentant des aspects macroscopiques caractérisant les bactéries lactiques (colonies de formes circulaires, à contour régulier, de couleur blanche avec un aspect laiteux de taille uniforme) sont repiquées et conservées dans des tubes contenant 10 mL de bouillon BHIB.

2. Purification et conservation des bactéries lactiques

La purification des bactéries est réalisée par un repiquage (une seule fois) sur les milieux MRS selon la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants). Après 48 à 72 h d'incubation à 30°C, les colonies, bien distinctes et bien développées, sont prélevées et transférées dans des tubes contenant 10 ml du milieu liquide BHIB stérile et conservées à 4°C pour une période de courte durée (4 semaines). Chaque isolat est passé par des examens macroscopiques et microscopiques ainsi qu'une recherche de la catalase afin de confirmer leur appartenance au groupe de bactéries lactiques (Lore et al., 2005).

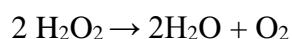
3. Identification morphologique

3.1 Caractérisation macroscopique

Pour déterminer les caractères culturels (forme, aspect, taille, couleur), l'étude morphologique est portée sur l'observation macroscopique des colonies sur boîtes de Pétri et à l'aide d'une loupe binoculaire (Joffin et Leyral, 2006).

3.2 Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Matériel et méthodes

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une goutte de l'isolat de bactérie lactique sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H₂O₂ à 10 volumes. La présence de l'enzyme se révéla par un dégagement de bulles de gaz (**Boubekri et Ohta, 1996**). Notons que les bactéries lactiques sont Gram positif et catalase négative.

3.3 Observation microscopique

3.3.1 Coloration de Gram

Dans cette étude, la détermination de Gram a été réalisée selon la technique de **Singleton (1999)**. Une goutte de la suspension bactérienne est déposée sur une lame, fixée à la chaleur (frottis) et colorée par le violet de cristal et rincée rapidement à l'eau courante. Ensuite, la lame fixée est traitée pendant une minute par Lugol, et de nouveau rincée rapidement. Puis, la lame est décolorée avec l'éthanol (95%) et rincée immédiatement avec de l'eau courante. Enfin, la lame est traitée pendant 30 secondes par la Fushine. Après un bref rinçage, la lame est séchée puis observée à l'objectif 100 à immersion (grossissement X 1000) pour déterminer le Gram, l'aspect morphologique, la forme et la taille de la bactérie isolée.

4. L'aspect sécuritaire

4.1 Test d'hémolyse

Pour la mise en évidence de l'activité hémolytique des bactéries lactiques isolées, la surface de la gélose au sang additionnée du sang humain à 7% (v/v) estensemencée en surface avec 0.1 ml de chaque suspension bactérienne précédemment préparée selon la méthode décrite par **DeVuyst et al. (2003)**. Après incubation à 30°C pendant 24-48 h, l'activité hémolytique est interprétée comme suit :

- la présence d'une couleur verte autour des colonies (hydrolyse partielle): **α** hémolytique.
- la présence d'une zone claire d'hydrolyse autour des colonies (hémolyse totale): **β** hémolytique.
- absence de réaction hémolytique autour des colonies (absence d'hémolyse) : **Χ** hémolytique

Notons que, dans cet essai la bactérie *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisé comme un témoin de **β** hémolyse, et chaque boîte est répétée deux fois afin de prendre en considération l'erreur expérimentale.

4.2 Le pouvoir d'antibiorésistance

Pour l'étude d'antibiorésistance des bactéries lactiques, six antibiotiques ont été testés: Penicilin-G (P, 10 µg), Tétracycline (TE, 30 µg), Ampicilline (Amp, 10 µg), Vanomycine (VA, 30 µg), Erythromycin(E, 15 µg), et Chloromphenicol (C, 30 µg), utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par NCCLS (2004). A partir des suspensions bactériennes précédemment préparées dans un bouillon BHIB, 0.5 ml de chaque culture ont été transférées dans 10 ml d'eau physiologique (0.9 %) pour obtenir une suspension bactérienne de 10^8 UFC/ml (Ahmadova et al, 2013). Pour chaque isolat, 0.1 ml a étéensemencée en surface du milieu gélosé MRS. A l'aide d'une pince stérile, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur le milieu MRS agar. Après incubation des boîtes à 30°C pendant 24-48 heures, les zones d'inhibitions ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les résultats de la lecture sont exprimés en millimètre (mm). Notons que, chaque boîte est répétée deux fois afin de prendre en considération l'erreur expérimentale.

Tableau N° 03 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour quelques bactéries Gram positif (OMS, 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Pénicilline	10 µg	≤14	-	≥15
Ampicilline	10 µg	≤16	-	≥17
Erythromycine	15 µg	≤13	14-22	≥23
Tétracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19
Vancomycine	30 µg	≤14	15-16	≥17
Chloramphénicol	30 µg	≤12	13-17	≥18

*R: Résistant; S: Sensible; I: Intermédiaire.

4.3 La production de gélatinase

La production de gélatinase a été testée sur le milieu gélosé MRS additionné 30 g/l de gélatine et 10 g/l de peptone (Rivas et al. 2012). La surface du milieu estensemencée avec 0.1 ml de chaque culture précédemment préparée en BHIB. Après incubation à 30 °C pendant 24-48 h, les boîtes ont été examinées, en recherchant les zones liquéfiée autour des colonies indiquant l'hydrolyse de la gélatine. Notons que chaque teste est répété deux fois afin de prendre en considération l'erreur expérimentale.

II.2 Isolement des levures

Pour l'isolement des levures, 10 g de chaque levain fermenté traditionnellement ont été homogénéisés avec 90 ml d'eau physiologique stérile pour obtenir une solution mère de 10^{-1} . A partir de cette solution mère, une série de dilutions décimales est réalisée jusqu'à 10^{-4} . Ensuite, 0.1 ml de chaque dilution est étalé en surface sur du milieu de culture sélectif YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) agar additionné de chloramphénicol (0.1 g/l) comme inhibiteur bactérien (Tsegaye et al., 2018). Après 72 h d'incubation à 25°C, les colonies caractéristiques des levures se développent à la surface du milieu en formant des colonies présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe. Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires (JORADP, 2015).

3. Purification et conservation des levures

La purification des levures est réalisée par un repiquage (une seule fois) sur les milieux YPD-Chloramphénicol selon la méthode d'épuisement de charge (méthode de quadrants). Après 72h d'incubation à 25°C, les colonies, bien distinctes et bien développées, sont prélevées et transférées à des tubes contenant (10 ml) des bouillons de YPD stérile pour l'isolement sélective. L'incubation de toutes les tubes ont été effectuée à 25°C jusqu'à l'obtention de trouble et dégagement de gaze apparentes. Après incubation, les isolats ont été conservés à 4°C pour une période d'un mois. Chaque isolat passé par des examens macroscopiques et microscopiques afin de confirmer leur appartenance au groupe de levures (Michael et John., 2006).

4. Identification morphologique

4.1 Observation macroscopique

L'étude de l'aspect macroscopique consiste à observé à l'œil nue la taille (petite, moyenne, grande) et la forme de colonies (ronde, irrégulière, etc.), de la transparence, de l'élévation de la colonie (bombé), de type de la colonie et le relief (Camille., 2007). Les colonies caractéristiques des levures se développent à la surface du milieu en formant des colonies présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus au moins convexe. Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface d'un milieu, peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

4.2 Observation microscopique

4.2.1 Observation à l'état frais

Cette technique a été utilisée pour déterminer la morphologie des levures vivantes, une goutte d'eau physiologique stérile a été déposée sur lame, puis à l'aide d'une anse de platine stérile, une colonie a été prélevée et dissociée dans la goutte d'eau physiologique et recouverte par une lamelle. L'observation a été réalisée au microscope optique à l'objectif (X40) pour déterminer l'aspect morphologique des cellules végétatives (**Singleton., 2005**).

4.2.2 Observation après coloration

Deux colorants ont été utilisés dans cette étude pour l'observation des frottis, le bleu de méthylène et le Lugol. Pour chaque isolat, une colonie est déposée sur une lame, fixée à la chaleur (frottis) et colorée par le bleu de méthylène ou le Lugol. Après un bref rinçage, la lame est séchée puis observée au microscope à l'objectif (X40) puis à immersion (X100) pour déterminer la forme (sphérique, ovoïde, allongée), la taille et le mode de reproduction des levures (bourgeoisement latérale ou polaire) (**Guiraud., 1998**).

5. L'aptitude technologique

5.1 La résistance au pH acide :

Pour déterminer la résistance des levures sélectionnées au pH acide en fonction du temps, le protocole de **Psomas et al (2001)** a été utilisé. Le test consiste à préparer une série de tubes contenant du bouillon YPD ajusté au pH 4 par l'addition de l'HCl 1M. Un inoculum de 1 ml de chaque isolat a été transféré dans 20 ml de ce bouillon pour obtenir une densité optique (DO₆₀₀) de 0.1 (**Ahmadova, et al (2013)**). Puis la croissance des levures a été mesurée toutes les quatre heures à la DO₆₀₀ pendant une incubation de 24 h à 30 °C (sans agitation) à l'aide d'un spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK).

5.2 La résistance à l'éthanol

Pour déterminer la capacité des espèces de levure à croître en présence d'éthanol à forte concentration, le protocole de **Thais et al (2006)** a été utilisé. Après l'autoclavage du bouillon YPD, l'éthanol a été ajouté à une concentration de 13 % (v/v), puis une série de tubes de 25 ml ont été préparés. Ensuite, un inoculum de 1 ml de chaque isolat a été transféré dans 20 ml de ce bouillon pour obtenir une densité optique (DO₆₀₀) de 0.1. Puis la croissance des

Matériel et méthodes

levures a été mesurée toutes les quatre heures à la DO_{600} pendant une incubation de 24 h à 30 °C (sans agitation) à l'aide d'un spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK).

5.3 La résistance aux sels biliaries

Pour déterminer l'aptitude des levures sélectionnées à résister aux sels biliaries en fonction du temps, la méthode décrite par **Psomas et al (2001)** a été utilisée. Après l'autoclavage du bouillant YPD, les sels biliaries d'origine bovine ont ajoutés à une concentration de 0.3 % (w/v), puis une série des tubes de 20 ml ont été préparés. Pour obtenir une densité optique (DO_{600}) de 0.1, un inoculum de 1 ml de chaque isolat a été transféré dans ces tubes. Ensuite, la croissance des levures a été mesurée toutes les quatre heures à la DO_{600} pendant une incubation à 30 °C/24 h (sans agitation) à l'aide d'un spectrophotomètre de type biochrom Libra S6 (80-5000-10, UK).

Notons que, tous les essais de l'aptitude technologique des levures sont répétés deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

Le présent travail a pour objectif d'isoler et d'identifier partiellement des bactéries lactiques et des levures à partir de levain fermenté traditionnellement afin de sélectionner des isolats pour étudier leur aptitude technologique.

I. Sourdough (levain)

Après la préparation de levain traditionnel, qui a subi une fermentation pendant 72h à la température 30°C, les résultats obtenus pour les deux échantillons préparés (S1 et S2) permettant de dire que l'opération de fermentation est bien déroulée car on observe un dégagement de CO₂, un changement de l'odeur et un doublement de la pâte (voir figures 04 et 05).



Figure N° 03 : Résultats de fermentation du Sourdough 1 (le premier échantillon additionné de la fève et le deuxième de l'abricot) (**Photographie originale 2020**).



Figure N° 04 : Résultats de fermentation du Sourdough 2 (le premier échantillon additionné de la fève et le deuxième de l'abricot) (**Photographie originale 2020**).

II. Isolement des bactéries lactiques

L'isolement des bactéries lactiques à partir des deux échantillons de levain prélevés sur milieu MRS a permis d'obtenir 28 isolats codés pour l'échantillon 1 : S1LAB1, S1LAB2, S1LAB3, S1LAB4, S1LAB5, S1LAB6, S1LAB7, S1LAB8, S1LAB9, S1LAB10, S1LAB11, S1LAB12, S1LAB13, S1LAB14, S1LAB15; et pour l'échantillon 2, les codes sont: S2LAB1, S2LAB2, S2LAB3, S2LAB4, S2LAB5, S2LAB6, S2LAB7, S2LAB8, S2LAB9, S2LAB10, S2LAB11, S2LAB12, S2LAB13.

II.1 Caractérisation morphologique

1.1 Caractérisation macroscopique

La caractérisation macroscopique permet de décrire l'aspect et les critères relatifs des colonies des bactéries lactiques obtenues sur le milieu MRS. Les colonies isolées sont de forme ronde ou lenticulaire, de différentes tailles, moyennes, et petites, de couleur blanchâtre et d'aspect lisse ou rugueux.

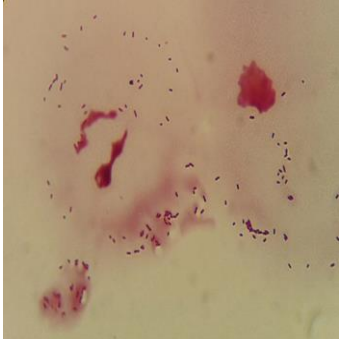

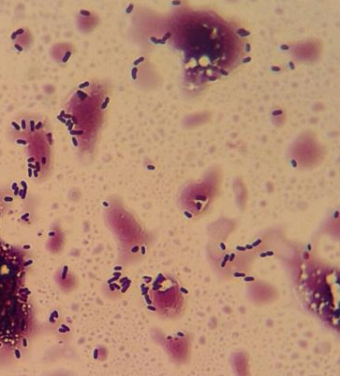
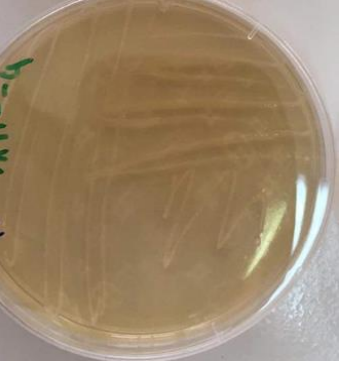
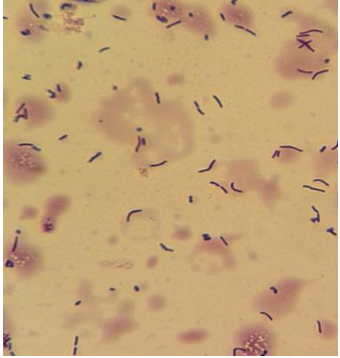

Les colonies des bactéries lactiques peuvent se présenter de forme circulaire ou ronde de taille variable, et de couleur blanchâtre les cellules sont apparentes de forme des bâtonnets longs et fins ou très courts ou coccobacilles, où la formation de chaînes de cellules est courante (**Dridier et Prévost, 2009**).

1.2 Caractérisation microscopique

Après la coloration de Gram, l'observation microscopique nous a permis de caractériser 22 isolats possédant une catalase négative. Parmi les 22 isolats, 19 isolats sont des bâtonnets à Gram positive de forme allongée ou courte, associés en paires ou en chaînettes plus ou moins courtes et qui appartiennent au genre *Lactobacillus* sp. , tandis que, 3 isolats sont de la forme des coques à Gram positive ovoïde ou sphérique en diplocoque, isolés ou associés, en courte chaîne ou en paires (Tableau 04).

Résultats et discussion

Tableau N° 04: Caractères morphologiques de quelques isolats de bactéries lactiques isolées à partir de levain fermenté traditionnelle et cultivées sur milieu MRS.

Isolats	Caractérisation microscopique (Coloration de Gram G $\times 1000$)	Caractérisation macroscopique (Colonies sur milieu MRS)
SILAB1		
SILAB4		
SILAB8		

2. Aspect sécuritaire des bactéries lactiques

2.1 Le pouvoir d'antibiorésistance

Le pouvoir d'antibiorésistance a été réalisé selon la norme **NCCLS (2004)**, en utilisant la méthode de diffusion en disque sur milieu gélosé MRS. Les résultats d'antibiorésistance des lactobacilles sélectionnés pour cette étude sont présentés dans le tableau (05). Ces résultats ont été obtenus après la mesure des zones d'inhibitions pour chaque antibiotique à l'aide d'un pied à coulisse et les comparer aux diamètres des valeurs critiques de la norme **NCCLS (2004)**, et qui ont été notés : R : Résistante, S : Sensible et I : intermédiaire.

D'après l'analyse des résultats dans le tableau (05), la majorité des lactobacilles isolés de levain fermentés traditionnellement (Sourdough) présente une résistance à la Vancomycine (78%), la Chloromphenicol (68%) et l'Erythromycine (68%), et une sensibilité à l'Ampicilline (47%), la Pénicilline (31%) et la Tétracycline (31%). Les lactobacilles isolés également présentent une réaction intermédiaire à l'Erythromycine (31%), la Tétracycline (21%) et la Chloromphenicol (21%). Donc, le profil d'antibiorésistance était différent et variable selon les isolats, à l'exception des isolats S1LAB3, S1LAB10, S1LAB12 et S2LAB18 qui sont résistants à tous les antibiotiques testés (multirésistants).

La sensibilité aux antibiotiques et la propriété intrinsèque de résistance aux antibiotiques des lactobacilles permettent de formuler des produits probiotiques sûrs pour la consommation humaine. De nombreuses souches de *Lactobacillus* sont naturellement résistantes aux différents antibiotiques tels que la Vancomycine (**Halder et al., 2017**). **Georgieva et al (2017)** ont signalé une sensibilité naturelle des isolats de lactobacilles (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum* et *L. plantarum*) à l'Ampicilline, à l'Erythromycine et à la Tétracycline. **Salminen et al. (2004)** ont également signalé une résistance intrinsèque des lactobacilles au Vancomycine, tandis que les isolats de *L. plantarum* ont été signalés comme sensibles à la plupart des antibiotiques testés, tels que la Pénicilline et l'Ampicilline. (**Halder et al., 2017**). D'autres études ont rapporté que les lactobacilles sont généralement sensibles aux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des protéines, comme le chloramphénicol, l'érythromycine, la clindamycine et les tétracyclines (**Temmerman et al., 2002; Baddour et al., 2004; Kacem et al., 2006**). En général, dans cette étude seulement 4 isolats (S1LAB6, S2LAB21, S2LAB25 et S2LAB26) sont sensibles à la Vancomycine, un antibiotique qui est considéré comme un problème de santé majeur dans le monde entier.

Résultats et discussion

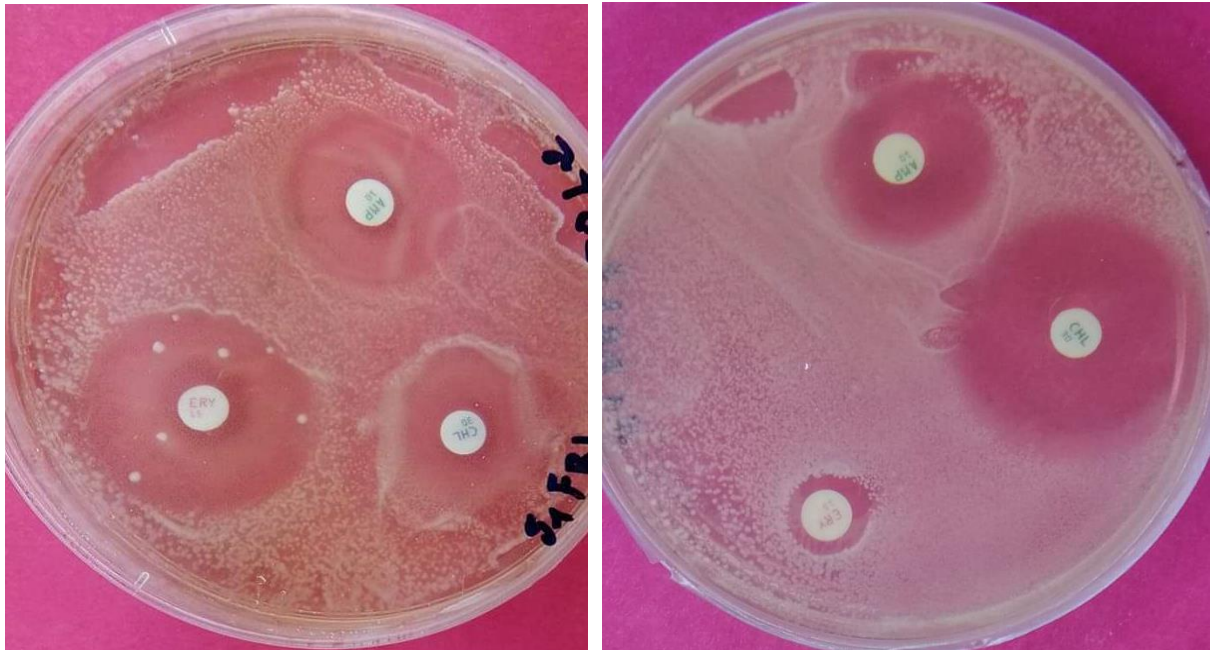


Figure №05 : Résultats de test de pouvoir d'antibiorésistance d'isolats (S1LAB8)
(Photographie originale 2020).

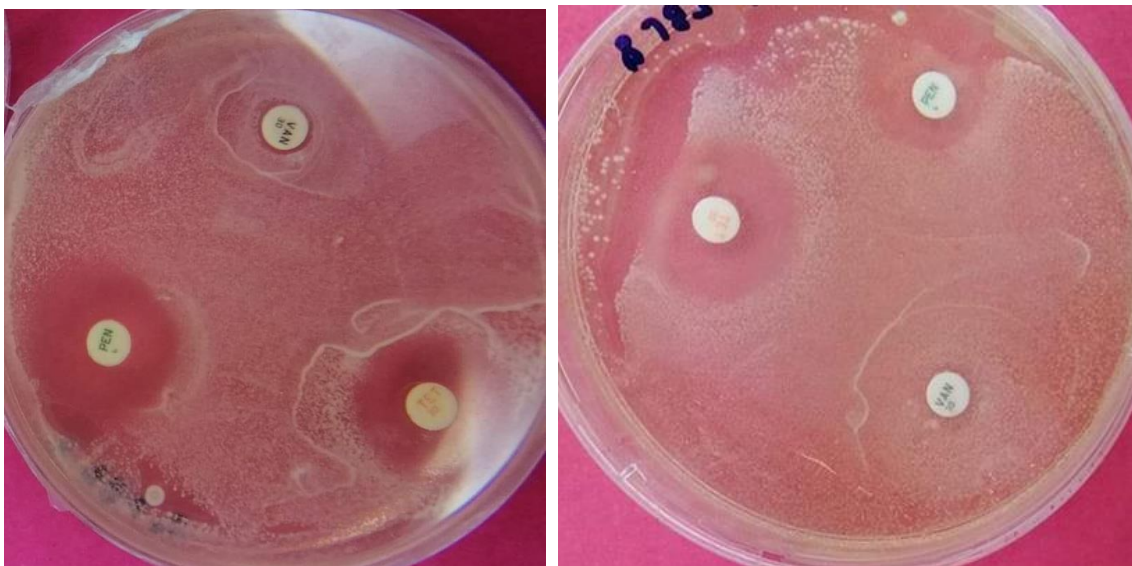


Figure № 06 : Résultats de test de pouvoir d'antibiorésistance d'isolats (S1LAB14)
(Photographie originale 2020).

Résultats et discussion

Tableau № 05 : Résultat du test antibiorésistance de bactéries lactiques sélectionnées pour cette étude.

Isolats	TE	Amp	E	C	P	VA
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB1	R	R	R	I	S	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB2	S	S	R	S	S	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB3	R	R	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB4	I	R	R	R	S	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB5	S	S	I	S	S	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB6	I	R	R	R	R	S
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB7	R	S	I	I	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB8	R	S	I	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB10	R	R	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB12	R	R	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB13	R	R	I	R	S	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB14	S	S	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB15	I	S	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB18	R	R	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB20	R	S	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB21	R	S	R	R	R	S
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB22	S	S	R	R	R	R
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB25	S	R	I	I	S	S
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB26	S	R	I	I	R	S

Résultats et discussion

2.2 La production de gélatinase

Les isolats de lactobacilles sélectionnés pour cette étude ont été testés sur l'activité de gélatinase en milieu MRS additionnée à 30 g/l de gélatine. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (06).

D'après l'analyse des résultats obtenus, 11(58%) isolats ont une gélatinase positive, donc ils sont capables de dégrader la gélatine (voir figures 07). On peut voir dans ces figures les zones de d'hydrolyse (dégradation) de la gélatine, ce qui montre que ces isolats possèdent le phénotype (GEL). Cette enzyme est produite par un microorganisme hydrolysant la gélatine en sous composés comme polypeptides, peptides et acides aminés, et qui pouvant traverser la membrane cellulaire et être utilisés par l'organisme (Joyce *et al.*, 2017). Sonbol *et al* (2013) ont rapporté que 5 isolats d'*E. Faecalis* sur 19 (26.3%) étaient résistants à la vancomycine et également producteurs de gélatinase. Dans la présente étude, 8 isolats de lactobacilles sur 11 producteurs de gélatinase et également présentent une résistance à la vancomycine. Donc, il y'a des déférents facteurs de virulence chez les bactéries lactiques, l'un de ces facteurs c'est la production de gélatinase. Sur le plan médical, la compréhension de ce facteur est devenue de plus en plus importante à cause de son danger associé à la pathogénèse des infections. Ce facteur a été trouvé en particulaire chez les entérocoques et testé sur des différents modèles des animaux infectés (Waters & al., 2003). La production de gélatinase a augmenté la pathogénicité chez un modèle animal (Singh *et al.*, 1998).

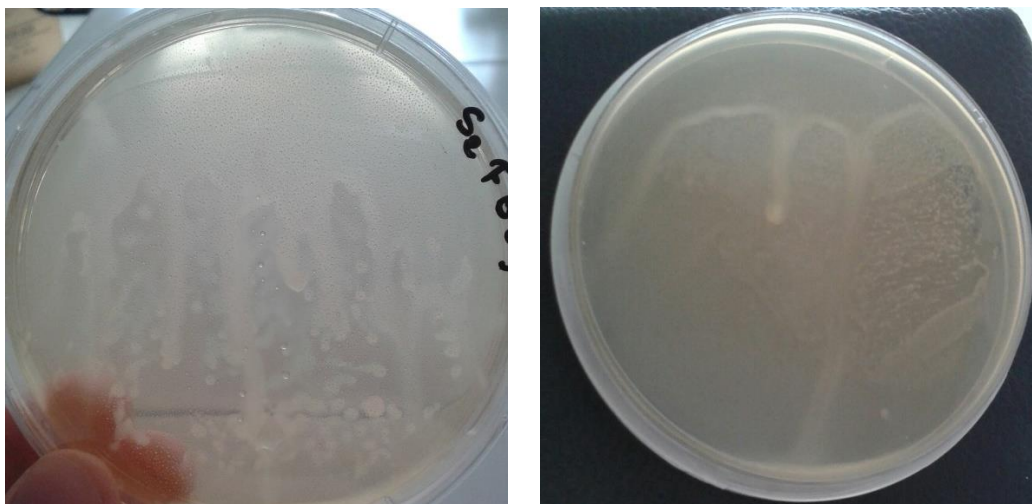


Figure N° 07 : Résultats de test de la production de la gélatinase des isolats S1LAB6 et S1LAB25 (Photo originale 2020).

Résultats et discussion

2.3 L'activité hémolytique

L'activité hémolytique des isolats de lactobacilles a été testée sur le milieu gélose au sang additionné du sang humain à 7% (v/v), et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau (06). Nos résultats montrent que 7 (37%) isolats de lactobacilles sont partiellement hémolytiques (α hémolyse), tandis que 12 (63%) isolats de lactobacilles sont α hémolytiques (absence d'hémolyse), ce qui indique l'aspect sécuritaire de nos isolats. Notons que, aucune réaction β hémolytique n'a été détectée dans *Lactobacillus* spp. testées.

La détermination de l'activité hémolytique est l'une des exigences de sûreté des souches probiotiques. **Maragkoudakis et al. (2006)** ont été testé l'activité hémolytique des isolats des lactobacilles sur la gélose Columbia, contenant 5% (v/v) de sang humain, leurs résultats ne montrent qu'aucune des souches examinées ne présentait de β -hémolyse. La plupart des souches (25 souches) étaient α -hémolytiques (c'est-à-dire absence d'hémolyse), tandis que quatre souches présentaient une hémolyse α . Nos résultats sont également en accord avec les observations rapportées par **(Bahri, 2014)** sur des souches de lactobacilles : *L. plantarum* F12, *L. brevis* G6 et *L. paracasei* B13 cultivées sur gélose columbia au sang humain.



Figure N° 08: Résultat de test de l'activité hémolytique d'isolats (S1LAB5) (Photo originale 2020).

Résultats et discussion

Tableau № 06 : Résultat de la production de gélatinase et de l'activité hémolytique des bactéries lactiques sélectionnées pour cette étude.

Isolats	Gélatinase	Activité hémolytique
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB1	+	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB2	-	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB3	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB4	-	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB5	-	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB6	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB7	+	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB8	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB10	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB12	+	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB13	-	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB14	-	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S1LAB15	-	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB18	-	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB20	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB21	+	α
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB22	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB25	+	χ
<i>Lactobacillus</i> sp. S2LAB26	-	α

III. Isolement des levures

L'isolement des levures à partir des deux échantillons de levain a permis d'obtenir 11 isolats codés pour l'échantillon 1 : S1Y1, S1Y2 et pour l'échantillon 2 : S2Y3, S2Y4, S2Y5, S2Y6, S2Y7, S2Y8, S2Y9, S2Y10, S2Y11.

III.1 Identification morphologique

1.1 Caractérisation macroscopique

Après l'incubation des levures sélectionnées pour cette étude pendant 3 jours à 25-28°C sur le milieu sélective YPD-chloramphénicol agar, les colonies se multiplient et deviennent visibles à l'œil nu. Les colonies présentent une forme arrondie à une couleur blanche ou opaque avec des reliefs plus au moins convexe et un contour souvent régulier et avec une surface lisse.

La forme levure est la plus simple des appareils végétatifs. Il se présente sous forme de cellule unique libre indépendante ou associées deux à deux ayant une morphologie caractéristique, à savoir : sphérique, ovoïde, cylindrique (**Bouix et Leveau, 1991**).

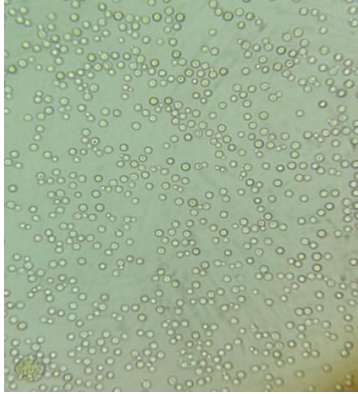
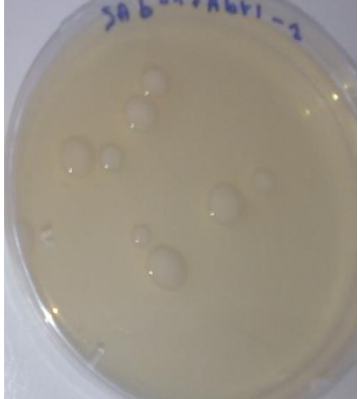
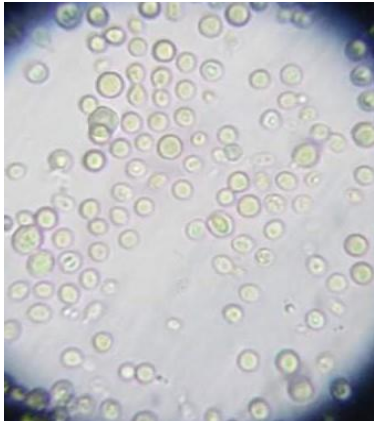
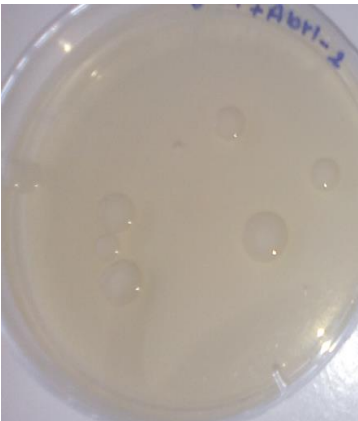
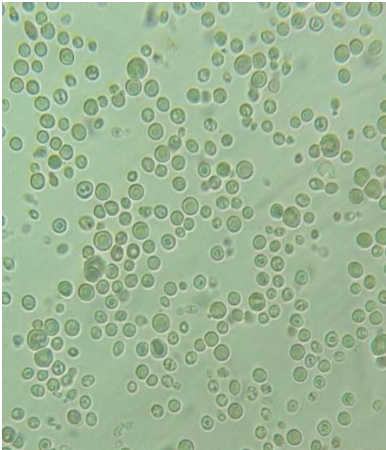

1.2 Caractérisation microscopique

L'observation microscopique a permis de déterminer la forme et la taille des cellules des levures sélectionnées. Les cellules sont immobiles, la forme des cellules est ovoïde ou sphériques, possédant d'un noyau et un cytoplasme entouré d'une membrane épaisse. Dans cette étude, 11 isolats de levures appartiennent au genre *Saccharomyces* sp. ont été sélectionnés pour étudier leur aptitude technologique (tableau (07) et Figure (09)).

Les levures sont des cellules eucaryotes; entouré par un cytoplasme contient les organites habituels des organismes végétaux supérieurs non photosynthétiques. La cellule est protégée par une paroi rigide (**Bouix et Leveau, 1991**).

Résultats et discussion

Tableau N° 07 : Caractères morphologiques de quelques isolats de levures isolées à partir de levain fermenté traditionnellement et cultivées sur milieu YPD-chloramphénicol.

Isolats	Caractérisation microscopique (G \times 400)	Caractérisation macroscopique
S1Y1		
S1Y2		
S2Y8		

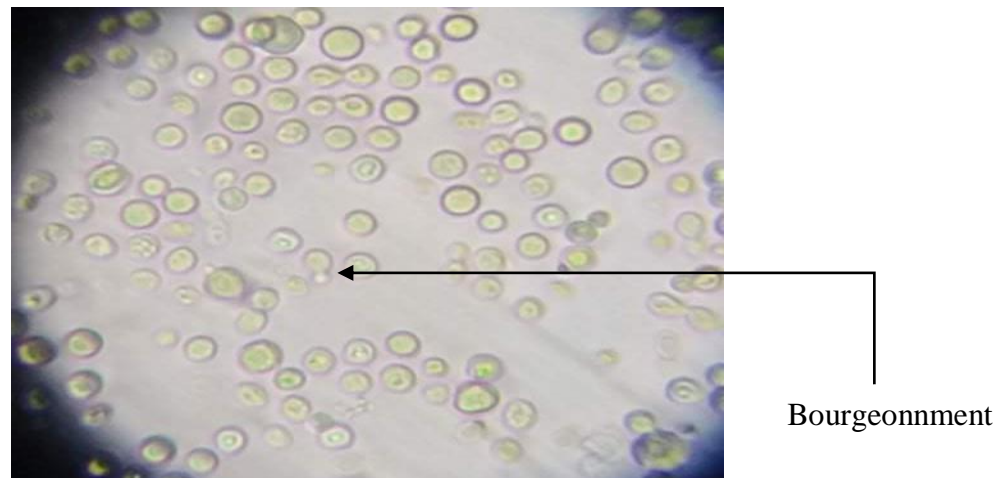


Figure № 09 : Observation microscopique de l'isolat S2Y3 après la coloration de bleu de méthylène (G \times 400) (Photo originale 2020).

2. L'aptitude technologique

2.1 La résistance au pH acide

Les résultats de la résistance des isolats de levures sélectionnés au pH 4 sont présentés en détails dans le tableau (08). Avec une importante variation en fonction de l'espèce *Saccharomyces* sp., 07 isolats sur 11 sont capables de croître au pH 4 (acide). Ces isolats ont pris un temps de tolérance pour s'adapter au pH acide, puis ont commencé la croissance avec une légère augmentation après 16 h d'incubation. Néanmoins, les autres isolats *Saccharomyces* spp. S1Y6, S1Y7, S1Y8 et S1Y11 sont sensible au pH acide car ils ont affiché un temps de tolérance très important pour s'adapter au pH 4, puis leur croissance est diminuée après 20 h d'incubation. Notons que, l'isolat de *Saccharomyces* sp. S1Y2 semble être la plus résistante au pH 4, car sa croissance en milieu acide est plus rapide par rapport aux autres isolats testés. Elle atteint une valeur maximale de 5 à 6×10^6 UFC/ml équivalent d'une DO_{600} égale 0.35 après 24 heures d'incubation. La capacité des souches à résister aux au pH acide et en présence de sels biliaires indique leur potentiel de survie dans le tractus gastro-intestinal humain (Qvirist et al., 2016). Il existe beaucoup espèces des levures capables à croître d'un milieu de pH 3, voir même à pH 1.5. En général, le milieu optimum pour la croissance des levures est entre pH 4.5 à 6.5, mais leur croissance maximale au pH 7

Résultats et discussion

et 8. (Delarras., 2014). Différent souches des levures ont un taux népérien de croissance est de 0.27/h à pH 7. Ce taux baisse sensiblement pour des pH inférieurs à 3 et supérieurs à 7 (Ratomahenina et al 1981). Qvirist et al. (2016) ont rapporté que toutes les souches de *S. cerevisiae* sont également bien développées au pH 3, à l'exception de deux souches. De plus, les souches de *Candida zeylanoides* et *Debaryomyces hansenii* isolées de sucuk turc fermenté pouvaient croître au pH 3.5 et 4, alors qu'elles ne pouvaient pas croître au pH 1.5. Certaines souches de *C. zeylanoides* sont développées à pH 2, tandis que *D. hansenii* n'a pas pu croître au pH 2 (Ozturk et Sagdic, 2014).

Tableau № 08 : Résultats de la résistance des isolats de *Saccharomyces* spp. au pH acide, mesurée à la DO₆₀₀ et exprimés en moyenne.

Isolats/heurs		0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
<i>Saccharomyces</i> S1Y1	sp.	0,1	0,12	0,1	0,12	0,14	0,18	0,16
<i>Saccharomyces</i> S1Y2	sp.	0,1	0,1	0,09	0,12	0,14	0,39	0,35
<i>Saccharomyces</i> S2Y3	sp.	0,1	0,07	0,07	0,1	0,12	0,17	0,21
<i>Saccharomyces</i> S2Y4	sp.	0,1	0,09	0,06	0,08	0,1	0,17	0,14
<i>Saccharomyces</i> S2Y5	sp.	0,1	0,1	0,05	0,04	0,04	0,05	0,07
<i>Saccharomyces</i> S2Y6	sp.	0,1	0,08	0,05	0,06	0,07	0,06	0,05
<i>Saccharomyces</i> S2Y7	sp.	0,1	0,08	0,04	0,05	0,06	0,04	0,04
<i>Saccharomyces</i> S2Y8	sp.	0,1	0,03	0,02	0,02	0,03	0,04	0,02
<i>Saccharomyces</i> S2Y9	sp.	0,1	0,04	0,06	0,04	0,03	0,08	0,07
<i>Saccharomyces</i> S2Y10	sp.	0,1	0,07	0,09	0,13	0,16	0,15	0,16
<i>Saccharomyces</i> S2Y11	sp.	0,1	0,01	0,03	0,04	0,04	0,01	0,02

2.2 La résistance à l'éthanol

Les résultats de la capacité des isolats de levures sélectionnés à croître dans un milieu à la forte concentration d'éthanol (13%, v/v) sont présentés dans le tableau (09). Ces résultats montrent que tous les isolats de levures sont capables de pousser dans un milieu à forte concentration d'éthanol. Six isolats ont affiché un temps de tolérance très court pour s'adapter à l'éthanol, puis ont commencé la croissance avec une augmentation rapide après 8 h d'incubation. Les autres isolats ont affiché un temps de tolérance très long pour s'adapter à l'éthanol, puis ont commencé la croissance avec une légère augmentation après 24 h d'incubation. Notons que, trois isolats de *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y9 et S1Y10 semblent être les plus résistantes à la forte concentration d'éthanol (13%, v/v), car leur croissance est plus rapide par rapport aux autres isolats testés et atteignent des valeurs maximales de 9×10^6 , 1.2×10^7 et 8×10^6 UFC/ml équivalent d'une DO_{600} égale 0.68, 0.83 et 0.60 après 24 heures d'incubation, respectivement. Une concentration appropriée d'éthanol est nécessaire dans la fabrication du pain pour obtenir la saveur préférée (Stanley et al., 2010). Différentes espèces de levures ont également été caractérisées sur leur capacité à tolérer des différentes concentrations d'éthanol. Ces espèces ont été isolées à partir de fruits locaux utilisés en industries boulangères et elles ont été bien poussées dans des milieux contenant des concentrations en éthanol allant de 2% à 14% (v/v), tandis que elles ont été échouées à croître à 15% (v/v) d'éthanol. Uniquement *Saccharomyces cerevisiae* a été bien poussée dans un milieu contenant de 13%, 14% et 15% d'éthanol, ce qui indique qu'ils tolèrent la toxicité de l'éthanol pendant la fermentation (Tsegaye et al., 2018). Nos résultats également concordaient avec les études de Ma'aruf et al. (2011), qui ont signalé que la majorité des espèces de levures pouvaient croître dans un milieu contenant 10% et 13% (v/v) de concentration d'éthanol alors que seules quelques espèces de levures pouvaient croître dans de l'éthanol à 15% (v/v). Une concentration élevée d'éthanol serait toxique pour la levure en inhibant la croissance cellulaire à cause de la destruction de la membrane cellulaire (Stanley et al., 2010).

Résultats et discussion

Tableau № 09 : Résultats de la résistance des isolats de *Saccharomyces* spp. à l'éthanol (13%, v/v), mesurée à la DO600 et exprimés en moyenne.

Isolats/ Heure	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
<i>Saccharomyces</i> sp. S1Y1	0.1	0,37	0,29	0,24	0,19	0,15	0.18
<i>Saccharomyces</i> sp. S1Y2	0.1	0,16	0,13	0,17	0,23	0,36	0,23
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y3	0.1	0,74	0,3	0,3	0,16	0,16	0,68
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y4	0.1	0,49	0,18	0,17	0,15	0,28	0,16
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y5	0.1	0,58	0,25	0,39	0,52	0,48	0,39
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y6	0.1	0,6	0,22	0,3	0,39	0,18	0,14
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y7	0.1	0,62	0,34	0,3	0,27	0,29	0,32
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y8	0.1	0,57	0,23	0,19	0,15	0,26	0,15
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y9	0.1	0,63	0,63	0,48	0,33	0,73	0,83
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y10	0.1	0,68	0,50	0,51	0,51	0,32	0,60
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y11	0.1	0,68	0,31	0,33	0,36	0,21	0,47

2.3. La résistance aux sels biliaires

Pour déterminer le pouvoir des isolats de levures sélectionnées pour cette étude à résister aux sels biliaires, leur croissance a été testée en milieu YPD additionné aux sels biliaires d'origine bovine (0.3% v/v), et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau (09). Tous les isolats ont commencé la croissance en présence de sels biliaires avec une augmentation rapide après 8 h d'incubation, à l'exception *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y8 et S1Y11 qui ont affiché un temps de tolérance très long pour s'adapter aux sels biliaires. Notons que, quatre isolats de *Saccharomyces* spp. S1Y1, S1Y2, S1Y4 et S1Y5 semblent être les plus résistantes aux sels biliaires, car leur croissance est plus rapide par rapport aux autres isolats testés et atteignent des valeurs maximales de 4 à 4.5×10^7 UFC/ml équivalent d'une DO_{600} allant 2.1 à 2.38 après 24 heures d'incubation. La tolérance biliaire des micro-organismes est l'un des critères importants à considérer lors du choix d'une culture probiotique. *Candida zeylanoides* et *Debaryomyces hansenii* étaient des souches dominantes dans les échantillons de sucuk turc fermenté. Tous les *C. zeylanoides* et *D. hansenii* testés pouvaient croître à la condition de 0.3% de sels biliaires (Ozturk et Sagdic, 2014). Les micro-organismes résistants à la bile peuvent survivre et croître dans le système gastro-intestinal (Psomas et al., 2001), ce qui concorde avec nos résultats.

Résultats et discussion

Tableau № 10 : Résultats de la résistance des isolats de *Saccharomyces* spp. aux sels biliaires, mesurée à la DO₆₀₀ et exprimés en moyenne.

Isolats/Heurs	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
<i>Saccharomyces</i> sp. S1Y1	0,1	0,53	1,35	1,61	1,87	1,96	2,34
<i>Saccharomyces</i> sp. S1Y2	0,1	0,4	0,34	1,3	2,26	2,41	2,38
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y3	0,1	0,17	0,18	0,18	0,18	0,2	0,22
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y4	0,1	0,51	0,76	0,71	0,65	0,86	2,1
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y5	0,1	0,27	0,37	1,15	1,92	2,04	2,1
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y6	0,1	0,79	0,82	1,01	1,2	1,49	1,59
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y7	0,1	0,16	0,12	0,38	0,65	0,73	1,24
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y8	0,1	0,24	0,16	0,2	0,24	0,2	0,43
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y9	0,1	0,7	1,38	1,44	1,5	1,52	1,71
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y10	0,1	0,05	0,12	0,78	1,49	1,49	1,47
<i>Saccharomyces</i> sp. S2Y11	0,1	0,13	0,14	0,22	0,3	0,33	0,24

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de ce travail est d'isoler et d'identifier partiellement des bactéries lactiques et des levures à partir de levain fermenté traditionnellement (Sourdough), afin de sélectionner des isolats pour étudier leur aptitude technologique. L'isolement des bactéries lactiques et des levures à partir de levain a permis d'identifier partiellement 19 isolats de bactéries appartiennent au genre *Lactobacillus* spp. et 11 isolats de levures appartiennent au genre *Saccharomyces* spp.

L'étude de l'aspect sécuritaire des bactéries lactiques a montré que la majorité des lactobacilles isolés de levain fermentés traditionnellement présente une résistance à la Vancomycine (78%), la Chloromphenicol (68%) et l'Erythromycine (68%), et une sensibilité à l'Ampicilline (47%), la Pénicilline (31%) et la Tétracycline (31%). Le profil d'antibiorésistance étaient donc différent et variable selon les isolats, à l'exception des isolats S1LAB3, S1LAB10, S1LAB12 et S2LAB18 qui sont résistants à tous les antibiotiques testés (multirésistante). De plus, 11(58%) isolats ont une gélatinase positive et 7 (37%) isolats de lactobacilles sont partiellement hémolytique (α hémolyse), tandis que 12 (63%) isolats de lactobacilles sont γ hémolytiques (absence d'hémolyse). Notons que, aucune réaction β hémolytique n'a été détectée dans *Lactobacillus* spp. testées.

L'étude de l'aptitude technologique des levures a permis de déterminer que 7 isolats sur 11 sont capables de croître à pH 4 (acide) dont l'isolat de *Saccharomyces* spp. S1Y2 semble être la plus résistante au pH 4. En outre, tous les isolats de levures sont capables de pousser dans un milieu à forte concentration d'éthanol (13%, v/v), où trois isolats de *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y9 et S1Y10 semblent être les plus résistantes à la forte concentration d'éthanol. À l'exception *Saccharomyces* spp. S1Y3, S1Y8 et S1Y11 les isolats de levures ont également toléré la présence des sels biliaries (0.3% v/v) dans le milieu YPD dont quatre isolats de *Saccharomyces* spp. S1Y1, S1Y2, S1Y4 et S1Y5 semblent être les plus résistantes aux sels biliaries.

Le présent travail est un point de départ pour la recherche des ferments lactiques et de levures à partir de levain fermenté traditionnellement (Sourdough), afin de sélectionner des isolats pour pouvoir être utilisés comme cultures starters en industrie des aliments fermentées et en panification. Néanmoins, cette étude primaire nécessite d'être poursuivi par d'autres travaux complémentaires et qui peuvent être envisagées comme perspectives :

- Confirmer génotypiquement les différents isolats de lactobacilles et de levures testées,

Conclusion et perspectives

- Etudier d'autres aspects sécuritaires des bactéries lactiques tels que l'absence de facteurs de virulence, la confirmation génotypique de leur profil d'antibiorésistance et la détermination des bactériocines.
- Evaluer le pouvoir fermentaire des levures incorporées dans des matrices alimentaires, afin de déterminer les changements organoleptiques des produits fermentés (texture, saveur, odeur...etc).

Reference bibliographiques

Reference bibliographiques

"A "

Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T. M., Kuliyeu, A., ... & Haertlé, T. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*, 30(2), 631-641.

Alard, J., Lehrter, V., Rhimi, M., Mangin, I., Peucelle, V., Abraham, A. L., ... & Wolowczuk, I. (2016). Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental microbiology*, 18(5), 1484-1497.

"B "

Ba, A., Ratomahenina, R., Graille, J., & Galzy, P. (1981). Study of the growth of some strains of yeast on the by-products of the refining of peanut oil. Valorization tests for neutralization pastes. *Oilseed*, 36 (8-9), 439-445.

Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005). Phenotypic characterization of lactic bacteria isolated from raw goat milk of two local "arabia and kabyli" caprine populations. *Science & Technology. C, Biotechnologies*, 30-37.

Baddour, L. M., Yu V. L., Klugman, K. P., Feldman, C., Ortqvist A., Rello J., Morris. A., J., Luna. C. M.,(2004). Combination antibiotic therapy lowers mortality among severely III patients with pneumococcal bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med*, 170: 440-444.

Bahri, F. (2014). Isolment et caracterisation des souches de lactobacilles a caracteres probiotiques a partir de selles d'enfants.

Béguin. J, Coarer. M, Poulard. A, Poupault. P & Vinsonneau .E ,(2008). Maîtrise des fermentations spontanées et dirigées. Institut Français de la Vigne et du Vin.

Boubekri, K., & Ohta, Y. (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(4), 501-505.

Bouix, M. & Leveau, J.Y., (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC& DOC, Paris, 08, 2-92.

Bouix, M. (1991). Les levures Ds: Bourgeois CM, Leveau JY, Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Lavoisier-Tec & Doc, Paris, 3, 206-229.

Reference bibliographiques

Bourgeois, C. M., & Larpent, J.P. (1996). Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Ed © Technique Documentation Lavoisier, Paris.

"C"

Camille, D. (2007). Microbiology pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier. p 128-129.

Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1-2), 131-149.

Chandan, RC (2006). History and consumption trends. Manufacturing yogurt and fermented milks , 1 (3.21), 5-400. In addition to this, you need to know more about it.

Collins, M. D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Feresu, S., & Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37(4), 310-316.

Colwell, R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio* numerical taxonomy of *Vibrio cholerae* parahaemolyticus and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol* 104, 410-433.

Corsetti, A. (2013). Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 85-103). Springer, Boston, MA.

Chiron, H., Roussel, P. (2005). Les Pains français, évolution, qualité, production p433

"D"

De Vuyst L., Foulquie Moreno M. R. et Revets H. (2003). Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84(3), 299-318.

Drider, D., & Prevost, H. Eds. (2009). Bactéries lactiques physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles. *Economic*.

Dortu, C., & Thonrat, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêt pour la bioconservation des produits alimentaires. *Bioéthnologie. Agronomie. Société. Environnement*, 13(1) :143-154

Reference bibliographiques

Da Silva R.O, Batistote M, Cereda M.P (2013). Alcoholic fermentation by the wild yeasts under thermal, os-motic and ethanol stress. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56:161–169.

Delarras C. (2014). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de de contrôle ...produits cosmétique ,eaux produits pharmaceutique* Edi .Tec et Doc Lavoisier (paris).

Desmazeaud M.J. et Cogan. (1998). Role of cultures in cheese ripening. I n: Cogan T.M.,Accolas J.P (Eds.), *Dairy Starter Cultures*. VCH Publishers, Inc., NewYork. pp. 207231.

"F"

Fredot, E. (2005). *Connaissance des aliments:[bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique]*. Tec et Doc.

"G"

Guiraud J. P, (1998.) *Microbiologie alimentaire*. Dunod, PP: 320-652.

"H"

Hammes, W. P., Stolz, P., & Gänzle, M. G., (1996). Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advances in Food Science* 18, 176-184.

Hassan, À.N, & Frank J.F. (2001). *Starter Cultures and their use*. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York. 151-205.

Hayat, B. (2017). Mise au point d'une technique pour le suivi des cinétiques de fermentation de pâtes boulangères avec et sans gluten.

Halder, A., Yadav, B., Samuel, S. T., Kuruvilla, A., & Jose, R. (2017). A randomized controlled double blind trial comparing the effects of the prophylactic antibiotic, Cefazolin, administered at caesarean delivery at two different timings (before skin incision and after cord clamping) on both the mother and newborn. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 17(1), 340.

Reference bibliographiques

Holzappel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35(2-3), 109-116.

Hung, D. T., & Mekalanos, J. J. (2005). Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3028-3033.

Hansson, Anne-Marie. 1994. « Grain-paste, porridge and bread. Ancient cereal-based food. » *Laborativ arkeologi* 7: 5-20.

Hermier J., Lenoir J. et Weber F. (1992). *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. Edition CEPIL-Paris.

“J”

Joffin, J. N., Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique « Tome 1 »: Dictionnaire des techniques*. CRDP Aquitaine, Bordeaux.

Johnson, L. A. (2000). Corn: The major cereal of the Americas. In K. Kulp, & J. G. Ponte (Eds.), *Handbook of cereal science and technology*, 2nd ed. (pp. 31–80). New York: Marcel

Joyce, S., Milligan-Saville, J. S., Tan, L., Mykletun, A., ... & Mitchell, P. B. (2017). Can work make you mentally ill? A systematic meta-review of work-related risk factors for common mental health problems. *Occupational and environmental medicine*, 74(4), 301-310.

“K”

Kacem, M., Zadi Karzm H., et Karam N-E.,(2004). Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of Algerian green olive *Grasas y Aceite*, 55(4):385-393

“L”

Labrecque, M. H., (2003). *Study of the capacity of two yeast strains to degrade xylene*, Master in Microbiology Agricultural, Département of soil and Agricultural engineering, University Laval, Quebec.

Larpent, J. P, (1992). *La microbiologie de la fermentation panaiere*. Ed. APRIAJCDIUPA. PP : 65.

Reference bibliographiques

Larpent, J. P., & Larpent–Gourgau, M. (1991). Biotechnologie des levures. Edition Masson, paris.445

Larpent, J. P., & Larpent–Gourgau, M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3éme édit. Paris. P, 245, 246.

Leclerc H., Meyer A. & Deiana J. (1995). Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et techniques. Doin éditeurs, Paris. 73-92.

Leclerc, H., Gaillard, J., & Simonet, M. (1975). Microbiologie générale, doin éditeurs. Paris. p, 28.

Leveau, J. Y., & Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intéret industriel.

Lore, T.A., Mbugua, S. K., & Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *Lebensm.-Wissenschaft undTechnology*, 38: 125-130.

""M""

Maragkoudakis, P, A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of lactobacillus strains isolated drom dairy products. *International Dairy. Journal*, 16(3), 189-199.

Michael, T. M., John, M. M., & Jack, p. (2006). *Brock Biology of Microorganisms*.

Montel, M. C ., Beranger, C., & Bonnemaire J. (2005). Les fermentations au service des produits de terroir. Editions Quae.

""N""

NOUT, M. R' (2009). Rich nutrition from the poorest-Cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiology.*,26(7),685-692.

""O""

Oteng-Gyang K. (1984). Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. Ed. Lavoisier.

Reference bibliographiques

Paris. PP: 43-51.

Ozturk, I., & Sagdic, O. (2014). Biodiversity of yeast mycobiota in “sucuk,” a traditional Turkish fermented dry sausage: phenotypic and genotypic identification, functional and technological properties. *Journal of food science*, 79(11), M2315-M2322.

“P”

Paul Ross R, Morgan S, & Hill C (2002). Preservation and Fermentation: present and future, *Journal of Food. Microbiol*; 79: 3– 16.

Pilet M.F., Magras C., & Federighi M. (2005). Bactéries lactiques. In : bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240..

Pol, D. (1996). Travaux pratiques de biologie des levures: guide de laboratoire: des informations pratiques et les protocoles pour réaliser des manipulations et des expériences a tous les niveaux d'enseignement. Ellipses.

Prückler M, Cindy L, Akihito E, Manuel K, Klaus D.K, Francisco S, Eric A, & Wolfgang K (2015). Comparison of homo- and hetero fermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread; 211-219.

Psomas E, Andrighetto C, Litopoulou-Tzanetaki E, Lombardi A, & Tzanetakis N. (2001). Some probiotic properties of yeast isolates from infant faeces and Feta cheese. *Intl J Food Microbiol* 69(1–2):125–33.

Pommier, S. (2003). Dynamique de populations microbiennes en culture mixte: étude expérimentale en bioréacteur à membranes et modélisation du phénomène killer chez *Saccharomyces cerevisiae* (Doctoral dissertation, Toulouse, INPT).

Pourcher, A. M., Morand, P., Picard-Bonnaud, F., Billaudel, S., Monpoeho, S., Federighi, M., ... & Moguedet, G. (2005). Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of applied microbiology*, 99(3), 528-539.

Reference bibliographiques

"Q"

Qvirist, L. A., De Filippo, C., Strati, F., Stefanini, I., Sordo, M., Andlid, T., ... & Cavalieri, D. (2016). Isolation, identification and characterization of yeasts from fermented goat milk of the Yaghnob Valley in Tajikistan. *Frontiers in microbiology*, 7, 1690.

"R"

Rackham, H. 1967. *Pliny Natural History with an English translation in ten volumes*. Loeb Library edition. Vol. 5. Harvard University, Boston.

Riviere J. (1970). *Les applications industrielles de la microbiologie*. Collection Sciences agronomiques. Masson et Cie (ed.).31-195. Ronald

Roussel, Philippe, et Hubert Chiron. 2005. *Les pains français : évolution, qualité, production* (2° Ed.). Lavoisier.

Ratomahenina, R., & Galzy, P. (1981). Mutation modifying the serine pathway in methylotrophic bacteria. *Folia microbiologica*, 26(3), 179-183.

"S"

Salminen, S., Wright, A.V. & Ouwehand, À. C., (2004). *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects*. Marcel Dekker. Inc., U.S.A .p 628

Singleton, P. (1999).*Bactériologie*.4eme Edition. Dunod, Paris. 317 pages

Singleton, P. (2005). *Bactériologie : pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, cours*, (6e édn), Dunod.

Sonbol, F. I., El-Banna, T. E. S., Abdelaziz, A. A., & Al-Madboly, L. A. (2013). Gelatinase production, antimicrobial resistance and pheromone response of conjugative plasmids of *Enterococcus faecalis* isolated from Egypt. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4775-4786.

Stiles Michael E., Holzapfel Wilhelm H., (1997). *Lactic acides bacteria of foods and their curent taxonomy*. *Inter. J. Food microbiol*, 36 :1-29

Stanley, J., Jiang, Y., Bridges, F., Carter, S. A., & Ruhlen, L. (2010). Degradation and rejuvenation studies of AC electroluminescent ZnS: Cu, Cl phosphors. *Journal of Physics:*

Reference bibliographiques

Condensed Matter, 22(5), 055301.

Singh, S., Goswami, p., Singh R., et Heller, k. j., (2009). Application of molecular identification tools for lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT- Food science and technology, 42:448-457.

"T"

Tan, Q., Xu, H., Aguilar, Z. P., Peng, S., Dong, S., Wang, B., ... & Wei, H. (2013). Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough. Journal of food science, 78(4), M587-M593.

Temmerman. R., Pot, B., Huys G., et Swing, J., (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolated from probiotic products. International Journal of food Microbiologie, 81:1-10.

Thais M, Guimaraes DG, Moriel IP, Machado, Cyntia MT, Fet al. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. Braz J Pharm Sci 42: 119-126.

Tsegaye, Z., Tefera, G., Gizaw, B., & Abatenh, E. (2018). Characterization of Yeast Species Isolated from Local Fruits used for Bakery Industrial Application. J Appl Microb Res, 1, 21-26.

"V"

Vogel, R. F., Müller, M., Stolz, P., Ehrmann, M.m (1996). Ecology in sourdoughs produced.

Valamoti, S. M., Mangafa, M., Koukouli-Chrysanthaki, C., & Malamidou, D. (2007). Grape-pressings from northern Greece: the earliest wine in the Aegean?. Antiquity, 81(311), 54-61. by traditional and modern technologies. Advances in Food Science 18, 152-159.

"W"

Waters, C. M., Antiporta, M. H., Murray, B. E., & Dunne, G. M. (2003). Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. Journal of bacteriology, 185(12), 3613-3623.

