



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 : Remmache Malika

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

FILIERE : SCIENCES ALIMENTAIRES

OPTION : AGROALIMENTAIRE ET CONTROLE DE QUALITE

Thème

Isolement et identification partielle de levures du genre *Saccharomyces* à partir de produits laitiers : Antibiorésistance, activité antibactérienne et hémolytique

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	qualité
Mr. Becheur Mourad	MAA.	Président
Mm. Allali Khadidja	MCB.	Examinatrice
Mr. Houicher Abderrahmane	Pr.	Rapporteur

Promotion : Juin – 2023

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة عمار تليجي- الاغواط

كلية: العلوم

قسم العلوم الفلاحية

مذكرة ماستر

تقديم الطالبة: رماش مليكة

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

العزل والتحديد الجزئي للخمائر من صنف
Saccharomyces من منتجات الالبان: مقاومة المضادات
الحيوية، نشاط مضاد للجراثيم وتحليل الدم

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيد بشور مراد	استاذ مساعد ا	رئيسا
السيدة علالي خديجة	أستاذ محاضر ب	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	استاذ تعليم عالي	مقرا

الدفعة: جوان – 2023

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A la mémoire de mon cher grand-père « Aissa », qui nous a quitté cette année, de nous avoir toujours encouragé de poursuivre nos études jusqu'au bout.

A mes chers parents,

Mon cher papa « Djelloul », qui a toujours été mon exemple et ma force durant les périodes durs, pour son amour inconditionnel et son soutien.

Ma chère maman « Amina Djoudi », qui m'a permis de devenir ce que je suis aujourd'hui, car toute réussite dans ma vie est grâce aux sacrifices de ma tendre mère, rien de ce que je dirai ne suffira pour lui exprimer ma gratitude.

A mes chers frères « Idris, Younes, Aissa et Ayoub » et ma chère sœur « Djihane », les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A ma chère grand-mère « Khadra », pour ses prières.

A le petit « Houssine ».

A toute ma grande famille et mes amis.

Remerciements

Je remercie « ALLAH » le tout-puissant, de m' avoir donné le foie, le courage et la confiance en moi-même pour pouvoir mener à terme ce présent travail.

*Ma gratitude et ma profonde reconnaissance à mon promoteur : Monsieur **Pr. Houicher Abderrahmane**, pour m' avoir fait l' honneur de me confier la réalisation de ce sujet et m' avoir permis de travailler sous sa responsabilité en me guidant et m' encourageant, qu' il trouve dans ces mots l' expression de mes vifs remerciements.*

*Je tiens à remercier Monsieur, **Dr. Becheur Morad**, pour m' avoir fait l' honneur d' accepter la présidence de mon jury de soutenance. Qu' il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.*

*Mes vifs remerciements s' adressent également à Madame, **Dr. Allali Khadidja** d' avoir honoré et accepté d' examiner ce travail.*

*Je remercie Monsieur, **Dr. Ararem Ahmed** pour son aide et ses conseils.*

Mes sincères remerciements à mes parents qui m' ont toujours soutenu tout au long de mon parcours.

Je remercie également mes frères et ma sœur pour leurs encouragements.

Thème : Isolement et identification partielle de levures du genre *Saccharomyces* à partir des produits laitiers : Antibiorésistance, activité antibactérienne et hémolytique.

Etudiante : Remmache Malika

Résumé :

Le but de la présente étude est d'isoler et identifier partiellement des levures du genre *Saccharomyces* à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement et d'étudier leurs aspect sécuritaire et fonctionnel en tant que probiotiques. L'isolement sélectif nous a permis d'identifier 7 isolats de levures appartiennent au genre *Saccharomyces* spp. Le test de l'assimilation des sources carbonés nous a montré que tous les isolats sont capables de fermenter le fructose et le sucrose et incapable d'assimiler l'arabinose. De plus, tous les isolats de levures testés ne présentent aucune activité hémolytique (γ hémolyse) et possèdent ainsi une activité protéolytique remarquable. Toutes les *Saccharomyces* spp. isolées ont également résisté aux antibiotiques testés (Erythromycine, Ampicilline, Gentamicine et Tetracycline) et montré une meilleure activité antibactérienne contre tous les gram-positifs testés (*Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*). Néanmoins, aucune une activité antibactérienne n'a été observée vis à vis *Escherichia coli*, bacilles gram négatif. Ce travail est une étude préliminaire inscrit dans le cadre de la recherche des levures du genre *Saccharomyces* afin de sélectionner des souches probiotiques pures pour pouvoir être utilisé dans le secteur alimentaire et/ou médical.

Mots clés : *Saccharomyces*, probiotique, hémolyse, protéolyse, antibiorésistance, activité antibactérienne, produit laitier.

Theme : isolation and partial identification of yeasts of the *Saccharomyces* genus from dairy products: antibiotic resistance, antibacterial and haemolytic activity.

Student : Remmache Malika

Abstract :

The aim of this study is to isolate and identify partially of yeasts of the *Saccharomyces* genus from traditional fermented dairy products and study their safety and functional aspects as probiotics. Selective isolation allowed us to identify 7 yeast isolates belonging to the genus *Saccharomyces* spp. The test of the assimilation of carbon sources showed us that all isolates are able to ferment fructose and sucrose and unable to assimilate arabinose. Moreover, all the yeast isolates tested show no haemolytic activity (γ haemolysis) and thus possess remarkable proteolytic activity. All *Saccharomyces* spp. isolates were also resistant to the tested antibiotics (Erythromycin, Ampicillin, Gentamicin and Tetracycline) and showed better antibacterial activity against all the gram-positives bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua*). However, no antibacterial activity was observed against *Escherichia coli*, gram-negative bacilli. This work is a preliminary study within the framework of the research of yeasts belonging *Saccharomyces* genus to select pure probiotic strains to be used in the food and/or in the medical sector.

Keywords: *Saccharomyces*, probiotic, haemolysis, proteolysis, antibiotic resistance, antibacterial activity, dairy product.

الموضوع: العزل والتحديد الجزئي للخمائر من جنس *Saccharomyces* من منتجات الألبان: مقاومة المضادات الحيوية، نشاط مضاد للجراثيم وتحليل الدم.

الطالبة: رماش مليكة

الملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتحديد خمائر من جنس (*Saccharomyces*) جزئيا من مشتقات الالبان المخمرة تقليديا ودراسة جانبها الوظيفي وسلامتها كبروبيوتيك. سمح لنا العزل الانتقائي بتحديد 7 عينات من الخميرة تنتمي الى جنس *Saccharomyces*. اظهر اختبار تحليل السكر (استهلاك الكربون) ان جميع العزلات لديهم القدرة على تحليل الكربون الموجود في السكروز والفركتوز وغير قادرين على استعمال الارابينوز. علاوة على ذلك فان جميع عينات الخميرة لا تظهر أي نشاط انحلاي (اختبار انحلال الدم γ) كما انها تمتلك نشاط تحلل ملحوظ للبروتين. إضافة الى ذلك فان جميع عينات الخميرة المختبرة كانت مقاومة للمضادات الحيوية المختبرة (Erythromycine, Ampicilline, Gentamicine و Tetracycline) وأظهرت فعالية أفضل كمضاد للبكتيريا ضد جميع إيجابيات الجرام المختبرة (*Listeria innocua* و *Staphylococcus aureus*) ومع ذلك لم يلاحظ أي نشاط مضاد للعصيات سالبة الجرام (*Escherichia coli*). هذا العمل عبارة عن دراية أولية في إطار بحث عن الخمائر من صنف *Saccharomyces* من أجل اختيار سلالات بروبيوتيك نقية لاستخدامها في قطاع الغذاء و/او القطاع الطبي.

الكلمات المفتاحية *Saccharomyces* - البروبيوتيك - انحلال الدم - تحلل البروتينات - مقاومة المضادات الحيوية - النشاط المضاد للبكتيريا - مشتقات الالبان.

Liste des figures :

Figure 1. Le barattage traditionnel à l'aide d'une « Chaquoa »	5
Figure 2. Illustration schématique pour la fabrication de produits laitiers fermentés traditionnellement	7
Figure 3. La cellule levurienne	9
Figure 4. Bourgeonnement unipolaire d'une cellule de levure	15
Figure 5. Les deux modes de reproductions par fission et par bourgeonnement	16
Figure 6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (à gauche) et <i>Saccharomyces boulardii</i> (à droite)	20
Figure 7. <i>Saccharomyces pastorianus</i> (à gauche) et <i>Saccharomyces uvarum</i> (à droite)	21
Figure 8. La levure en panification.	22
Figure 9. Brasserie en action.	24
Figure 10. La levure en vinification	25
Figure 11. Diagramme de différentes voies d'utilisation des levures.	28
Figure 12. L'exploitation privé de Mr. Guellouza (photographie originale 2023)	38
Figure 13. La vache laitière (photographie originale 2023)	38
Figure 14. Centrifugeuse (Eppendorf 5415 D, 22331Humberg)	44
Figure 15. Préparation des surnageants	44
Figure 16 : Logigramme représentant les étapes expérimentales de la présente étude	45
Figure 17. Résultat de la préparation des levains traditionnels à partir des trois échantillons traditionnels de Jben Lben et Zebda.	46
Figure 18. Aspect macroscopique des colonies caractéristiques des isolats Lc7 et Zc5	47
Figure 19. Caractérisation microscopique à l'état frais de l'isolat <i>Saccharomyces</i> spp. Lc8 sous l'objectif 40.	48
Figure 20. Résultat du test d'activité protéolytique des isolats Zc5 et Zc7	51
Figure 21. Résultat de test d'activité hémolytique des isolats Zc5 et Lc7	52
Figure 22. Résultat du test de résistance des levures du genre <i>Saccharomyces</i> aux antibiotiques	54
Figure 23. Résultat du test de l'activité antibactérienne des isolats de levures du genre <i>Saccharomyces</i>	55

Liste des tableaux :

Tableau 1. La composition du lait de vache	3
Tableau 2. Composants fonctionnels d'une cellule de levure idéale	10
Tableau 3. Diversité des formes de cellules de levure	12
Tableau 4. Produits industriels produits par les levures	23
Tableau 5. Sources de souches probiotiques courantes	30
Tableau 6. Principaux critères de sélection des souches probiotiques	35
Tableau 7. Information sur l'échantillonnage du lait utilisé dans cette étude.	37
Tableau 8. Résultats de l'assimilation des sources carbonés des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	50
Tableau 9. Résultats de l'activité protéolytique et hémolytique des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp	52
Tableau 10. Résultats de la résistance des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp aux antibiotiques (Amp, Gent, E et TE)	53
Tableau 11. Résultats de l'activité antibactérienne des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	56

Liste des abréviations :

- **Amp** : Ampicilline
- **BHIB** : Brain heart infusion
- **E** : Erythomycine
- **Gent** : Gentamicine
- **TE** : Tetracycline
- **YPD**: Yeast Extract–Peptone–Dextrose

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I : Les dérivés laitiers	
1. Généralité sur le lait	3
2. Les dérivés laitiers traditionnels	3
2-1. La fermentation	3
2-2. Les produits fermentés	4
2-2-1. Lben	4
2-2-2. Zebda	4
2-2-3. Jben	5
2-2-4. Klila	6
2-2-4-1. Klila fraîche	6
2-2-4-2. Klila sec (déshydraté)	6
2-2-5. Smen	6
3. La microflore du lait	8
Chapitre II : Les levures	
1. Définition des levures	9
2. Classification des levures	11
3. Taxonomie	11
4. Habitats naturels des communautés de levures	13
4-1. Le sol	13
4-2. L'eau	13
4-3. L'atmosphère	13
4-4. Les plantes	13
4-5. Les animaux	14
4-6. Construction et environnement	14

5. Mode de reproduction des levures	14
6. La croissance des levures	16
6-1. Les exigences nutritives	16
6-2. Les Exigences physiques	17
7. Les principaux métabolismes des levures	17
7-1. Source de carbone	17
7-2. Source d'azote	18
8. <i>Les Saccharomyces</i>	19
8-1. Les types de <i>Saccharomyces</i>	19
8-1-1. <i>Saccharomyces boulardii</i>	19
8-1-2. <i>Saccharomyces pastorianus</i>	19
8-1-3. <i>Saccharomyces uvarum</i>	19
8-1-4. <i>Saccharomyces florentinus</i>	20
8-1-5. <i>Saccharomyces paradoxus</i>	20
Chapitre III : Utilisation des <i>Saccharomyces spp</i>	
1. En technologie	22
1-1. Pain	22
1-2. Les boissons alcoolisées	23
1-2-1. La bière	23
1-2-2. Le vin	24
1-2-3. Le champagne	25
1-2-4. Le cidre	26
1-2-5. Saké	26
2. Utilisation probiotique	26
2-1. Utilisation en médecine	26
2-2. Utilisation en alimentation animal	27
2-2-1. Levure probiotique pour volaille	27
2-2-1. Levure probiotique pour ruminants	27
Chapitre IV : Les probiotiques	
1. Définition des probiotiques	29
2. Les levures probiotiques	29
3. Le rôle des probiotiques	30
4. Potentiel probiotique des levures	31

5. Les critères de sélection des probiotiques	32
5-1. Critères de sécurité	32
5-1-1. Identification de la souche	32
5-1-2. Innocuité	32
5-1-3. Origine	33
5-2. Critères fonctionnels	33
5-2-1. Survie au cours du transit digestif	33
5-2-2. Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus	33
5-2-3. Colonisation	34
5-2-4. Activité antimicrobienne	34
5-3. Critères technologiques	34
5-3-1. Viabilité et stabilité des microorganismes	34
5-3-2. Conservation	35
5-3-3. Propriétés organoleptiques	35
6. Risques des probiotiques	36

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes

I-1. Objectifs	37
I-2. Echantillonnage	37
I-3. Préparation de Lben	39
I-4. Préparation de l'échantillon de Zebda	39
I-5. Préparation de l'échantillon du Jben	39
I-5-1. La maturation	39
I-5-2. La coagulation	39
I-5-3. L'égouttage	40
I-6. Préparation des échantillons	40
I-7. Isolement des levures	40
I-8. Purification et conservations	40
I-9. Conservations des souches	41
I-10. Identification morphologique	41
I-10-1. Macroscopique	41
I-10-2. Microscopique	41
I-11. Assimilation des sources carbonées (Fermentation des sucres)	42

I-12. Activité hémolytique	42
I-13. Activité protéolytique	42
I-14. Résistance aux antibiotiques	42
I-15. Activité antibactérienne	43
II-Résultats et discussion	
II-1. Résultats d'isolement	46
II-2. Identification phénotypique	46
II-2-1. Macroscopique	46
II-2-2. Microscopique	47
II-3. Assimilation des sources carboniques	49
II-4. Activité Protéolytique	50
II-5. Résistance aux antibiotiques	53
II-6. Activité antibactérienne	54
Conclusion et perspectives	57
Références bibliographiques	58

Introduction

Introduction :

Le lait signifie depuis l'antiquité un symbole de richesse chez les civilisations anciennes. Les égyptiens, les grecs, les romains et les musulmans ont développé et s'intéressé en ce qui concerne la fermentation des aliments y compris le secteur de lait et produits laitiers, ils ont fabriqué des fromages et des boissons à base de lait cru. Nos jours le lait et ses dérivés représentent une part indispensable au secteur alimentaire chez tous les pays, car il représente un aliment complet, riche en nutriments de base (protéines, glucides et lipides) et sa richesse en vitamines et en minéraux, notamment en calcium alimentaire (**FAO, 1995**). Les dérivés laitiers sont préparés à la base par fermentation du lait soit de vache, brebis, chamelle ...etc. Le Lben par exemple est une boisson qui peut être préparé traditionnellement par fermentation spontanée du lait cru à la température ambiante pendant 24h à 48h jusqu'à coagulation (**Benkerroum et Tamime, 2004**). Ensuite, on peut extraire le beurre « Zebda » à partir de ce Lben par un barattage manuel dans une « Chaquoa ». Cette fermentation est menée par des bactéries lactiques et éventuellement d'autres micro-organismes, notamment des levures.

Les levures sont des microorganismes unicellulaires qui peuvent être utilisées dans plusieurs industries alimentaires (produits laitiers, boissons alcoolisées, panification...etc.) et notamment en médecine car ils possèdent des propriétés probiotiques importants, par exemple *Saccharomyces cerevisiae* extraites à partir des dérivés laitiers fermentés peut être considéré comme une souche probiotique (**Moradi et al., 2018**). Pour choisir une souche de levure qui représente des propriétés probiotiques nous devant tester par exemple ses critères de sécurité comme leurs activités hémolytiques et leurs résistances aux antibiotiques ainsi leurs critères fonctionnels comme leurs activités protéolytique et leurs inhibitions de certains genres de bactéries.

Dans le même contexte, le but de cette étude était d'isoler et identifier partiellement les levures du genre *Saccharomyces* à partir des produits laitiers fermenté traditionnellement et étudier leurs capacités à fermenté quelques sucres (le glucose, le fructose, le maltose, le lactose, le sucrose, le galactose et l'arabinose), leurs critères de sécurité (activités hémolytiques, résistances aux antibiotiques qui peut jouer un rôle très important dans le domaine médicale pour ses bienfaits sur la santé) ainsi que leurs critères fonctionnels (activité protéolytique et antibactérienne) (**Belhamra, 2017**) .

Notre travail est scindé en deux parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur les produits laitiers fermentés traditionnellement, le deuxième chapitre porte sur les levures et leurs caractéristiques, le troisième sur les utilisations industrielles des levures et le dernier chapitre sur les probiotiques.
- La deuxième partie expérimentale est basée sur l'isolement, purification, identification classique des levures, ainsi que l'étude de leurs profils probiotiques, enfin nous terminerons ce travail par une conclusion et des perspectives pour poursuivre cette étude.

Partie

bibliographique

Chapitre I : les dérivés laitiers

I-1- Généralités sur le lait

Le lait est un aliment de couleur blanchâtre produit par les cellules sécrétrices des glandes mammaires des mammifères femelles. Le lait sécrété dans les premiers jours après la parturition s'appelle le colostrum. Quelle que soit l'espèce, la fonction première du lait est de nourrir la progéniture jusqu'à ce qu'elle soit sevrée. Dans la plupart des civilisations humaines, le lait des animaux domestiques (vache, brebis, chèvre, jument, yak, chamelle, dromadaire, bufflonne, renne) est couramment consommé, mais l'industrialisation concerne principalement le lait de vache, et à plus petite échelle, le lait de brebis et de chèvre (**Vilain, 2010**). Le tableau ci-dessous regroupe la composition du lait de vache.

Tableau 1. La composition du lait de vache (**Deshapriya et al., 2019**).

COMPOSITION	POURCENTAGE
EAU	87.5
MATIERE SECHE	12.7
GRAISSE	4.5
PROTEINES	2.9
LACTOSE	4.1
CENDRE	0.8

I-2- Les dérivés laitiers traditionnels :

I-2-1- la fermentation :

Les historiens ont trouvé des preuves de fermentation dans des préparations alimentaires et de boissons remontant à 7000 av J-C. Cette fermentation, utilisé comme méthode de conservation, dépend de la croissance microbienne dans le produit fermenté et se caractérise par des changements de la qualité organoleptique des aliments (**Suliman, 2020**). C'est un processus de métabolisme central dans lequel un organisme convertit un glucide, tel que l'amidon ou le sucre, en alcool ou en acide. Par exemple, la levure effectue une fermentation

pour obtenir de l'énergie en convertissant le sucre en alcool. Les procédés de production de vins, bières et cidres sont traditionnellement réalisés avec les souches de *Saccharomyces cerevisiae*, la levure la plus courante et la plus disponible sur marché. Les levures jouent également un rôle clé dans le traitement des eaux usées ou la production de biocarburants. De nombreux autres produits industriels importants sont le résultat de la fermentation, comme le yaourt, fromage, pain, café (Maicas, 2020).

I-2-2- Les produits fermentés :

I-2-2-1. Lben :

Lben est un lait fermenté rafraichissant acide consommé en boisson d'accompagnement certains aliments ou un dessert. Le processus de fabrication traditionnel du Lben implique la fermentation du lait cru, ou éventuellement du lait de chèvre, contenant le lait de départ et/ou la microflore naturelle à température ambiante pendant 24 à 72 heures jusqu'à ce qu'un coagulum faible se développe. Le coagulum obtenu est baratté pour séparer le Lben du beurre formé (Mkadem et al., 2022). La composition physico-chimique de Lben est variable ; les valeurs moyennes des composants principaux sont : pH : 4,2 ; acidité titrable : 8,2 g d'acide lactique/l ; matières grasses : 8,9 g/l ; protéines totales : 25,6 g/l ; lactose : 26,9 g/l ; matière sèche totale : 89 g/l (Tantaoui-Elaraki et El Marrakchi 1987).

I-2-2-2. Zebda :

Selon le Codex Alimentarius, Zebda (beurre traditionnel) est un produit gras dérivé exclusivement du lait et/ou de produits obtenus à partir du lait, principalement sous forme d'une émulsion du type eau dans huile. Il est obtenu par barattage de la crème du lait (Benkerroum, 2013).

La Fermentation traditionnelle du lait et l'extraction du beurre (Zebda) est demeurée au stade familial ou artisanal : le lait est abandonné à lui-même dans une jarre en terre cuite ou une outre en peau de chèvre jusqu'à sa coagulation à température ambiante et dure 24 à 48 h suivant la saison. Le barattage qui lui succède est réalisé soit dans l'outre, qu'un manipulateur doit secouer énergiquement avec les deux mains (Figure 1), soit dans une jarre, en utilisant un instrument constitué d'un manche long portant à son extrémité inférieure deux disques en bois de diamètres différents. Dans les deux cas, cette opération dure 30 à 40 min. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de

l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre. Celui-ci est récupéré, généralement à la main, mais certains fabricants filtrent le Lben sur une toile, dans le but de recueillir le maximum de beurre (Tantaoui-Elaraki et al.,1983).



Figure 1. Le barattage traditionnel à l'aide d'une « Chaquoa » (Leksir et al., 2019).

I-2-2-3. Jben :

Le même produit est connu dans d'autres les pays arabes sous le nom de « Jibnah baida », qui signifie « fromage blanc ». Le lait cru (de vache, de chèvre ou un mélange des deux) est recueilli dans un vase en terre cuite et mis à fermenter spontanément à température ambiante jusqu'à coagulation. A ce stade, le caillé (Rayeb) est obtenu de la même manière que pour Lben, sauf qu'un volume plus important de lait est nécessaire et, par conséquent, la période de remplissage des moisissures s'étend sur une période de 3 à 4 jours. Le caillé est puis transféré dans un sac en tissu de mousseline qui est attaché et suspendu pour égoutter pendant 2 à 3 jours supplémentaires. Jben plus ferme est obtenu en prolongeant la période de drainage

jusqu'à 10 jours pour obtenir la consistance souhaitée. Le fromage est ensuite vidé du sac en tissu, coupé en morceaux, salé en surface et conditionné pour vidange supplémentaire **(Benkerroum et Tamime.2004)**. Avec une moyenne de 62,5% d'humidité, 16,5 % de matières grasses, 15,8 % de protéines brutes, 4,1 % de lactose, 1,04 % d'acidité titrable et pH 4,1 **(Leksir et al., 2019)**.

I-2-2-4. Klila:

I-2-2-4-1. Klila fraîche:

Pour éviter la dégradation pendant la phase de stockage, "Lben" est chauffé modérément (55–75 °C) jusqu'à ce que le lactosérum soit séparé ; le coagulum obtenu, appelé « Klila », fabriqué en plusieurs régions d'Algérie, est consommé comme fromage frais après drainage naturel **(Leksir et al., 2019)**.

I-2-2-4-2. Klila sec (déshydraté) :

Comme il peut être consommé frais, le fromage "Klila" peut également être coupé et séché (2 à 15 jours selon la saison) et puis utilisé après réhydratation comme ingrédient dans des préparations culinaires. Sous sa forme déshydratée, il peut être conservé plusieurs années à la température ambiante, dans des pots en terre cuite ou sacs en peau de chèvre **(Leksir et al., 2019)**.

I-2-2-5. Smen :

Le surplus de beurre produit est transformé en beurre rance « Smen » en lavant le beurre frais avec de l'eau tiède, saumurage, puis salage à sec (saupoudrage en surface, 8–10 g/100 g). Le smen est un dérivé gras du lait populaire dans les pays du Maghreb, notamment l'Algérie et le Maroc **(Leksir et al., 2019)**.

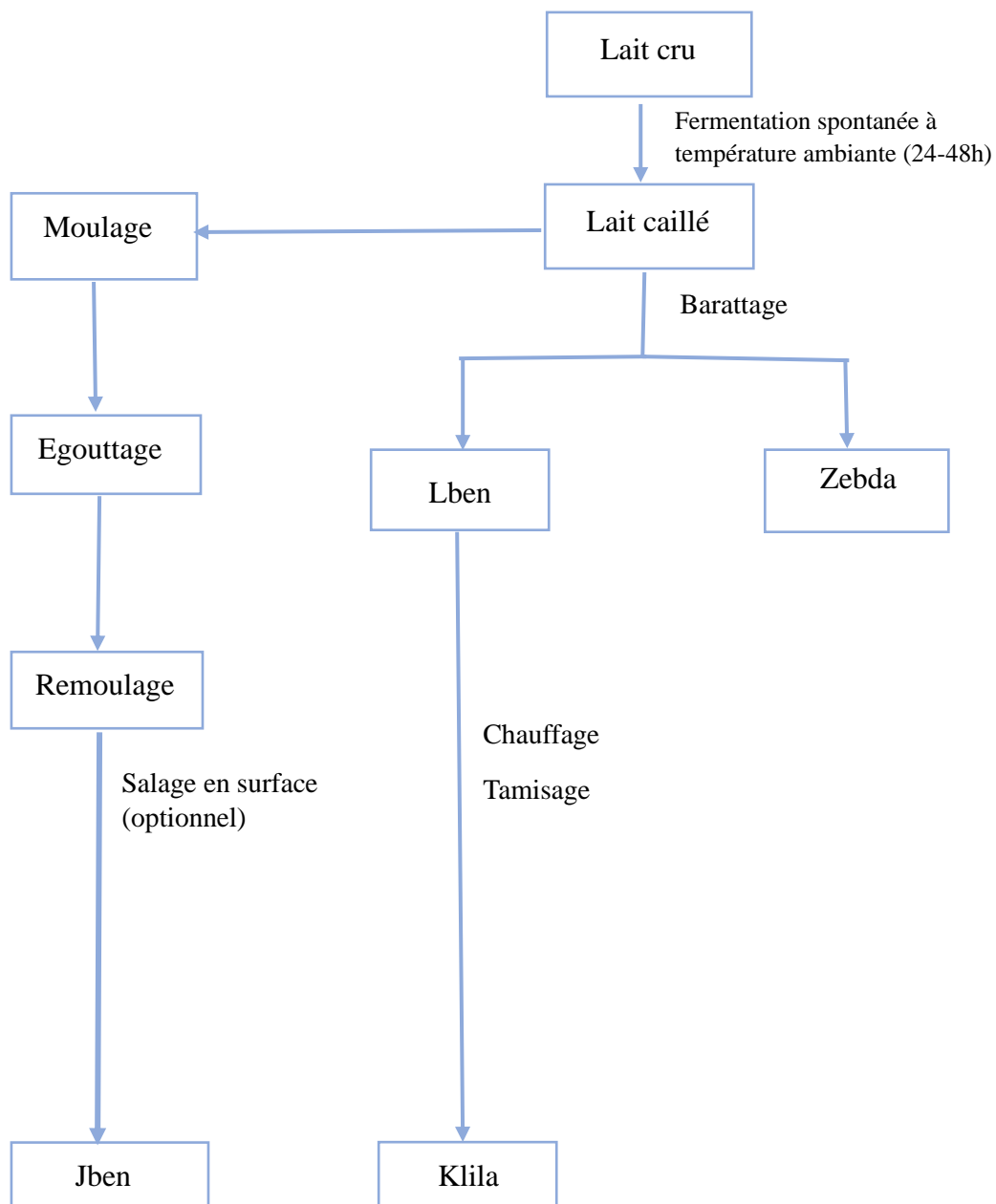


Figure 2. Illustration schématique pour la fabrication de produits laitiers fermentés traditionnellement (Benkerroum et Tamime, 2004).

I-3- La microflore du lait :

Les micro-organismes peuvent pénétrer dans le lait par contact avec l'animal, y compris les tétines, les peaux, les matières fécales ; également le logement, la litière, la nourriture, l'air et l'eau. Contacter avec matériel agricole et matériel de traite ainsi qu'une hygiène insuffisante de la ferme ou du personnel peut influencer la teneur microbienne du lait. Selon **Quigley et al. (2013)**, une fois dans le lait, ces micro-organismes peuvent jouer un rôle important dans la fabrication de produits laitiers ; ils peuvent contribuer à promouvoir la santé humaine ou l'amélioration de la sécurité alimentaire. D'autre part, ces micro-organismes peuvent entraîner la détérioration du lait et des produits laitiers ou ils peuvent contribuer aux maladies chez les humains. Parmi ces microorganismes, on peut citer :

- **Microorganisme qui contribue aux technologies alimentaires :** *Lactocoque, Lactobacille, Streptocoque, Leuconostoc, Entérocoque, Propionibactérie,*
- **Microorganismes de détérioration :** *Pseudomonas, Acinetobacter, Chryséobactérie Clostridium, Phage,*
- **Microorganismes pathogènes :** *Listeria, Staphylocoque, Escherichia coli, Campylobacter Mycobactérie, Champignons – Aflatoxine,*
- **Microorganismes bénéfiques pour la santé :** *Lactocoque, Lactobacille, Streptocoque, Leuconostoc, Entérocoque* et Certaines levures.

Chapitre II : Les levures

II-1. Définition des levures :

Les levures sont des micro-organismes eucaryotes (noyau délimité), non photosynthétiques, chimio-hétérotrophes (puisent leur énergie dans la dégradation de substances organiques variées), champignons à thalle unicellulaire immobiles. Le thalle de la levure est l'appareil végétatif le plus simple, sans racine ni tige, sans rameau feuillu et non chlorophyllien. Leur morphologie est d'une grande importance taxonomique. Leur taille est d'environ 20 μm en longueur et de 1 à 10 μm en largeur. Les levures sont de grande taille par rapport aux bactéries ce qui rend possible l'examen direct. La masse cellulaire des levures est 100 fois plus grande que celle des bactéries et elles se divisent 4 fois moins rapidement. De par leur croissance moins rapide, elles ne peuvent donc pas leur nuire en épuisant les réserves nutritives du milieu. Néanmoins, elles peuvent aisément supporter leur compétition. Par ailleurs, elles sont parfois utiles à d'autres microorganismes comme les bactéries lactiques à qui elles apportent les acides aminés nécessaires (Hancké, 2000).

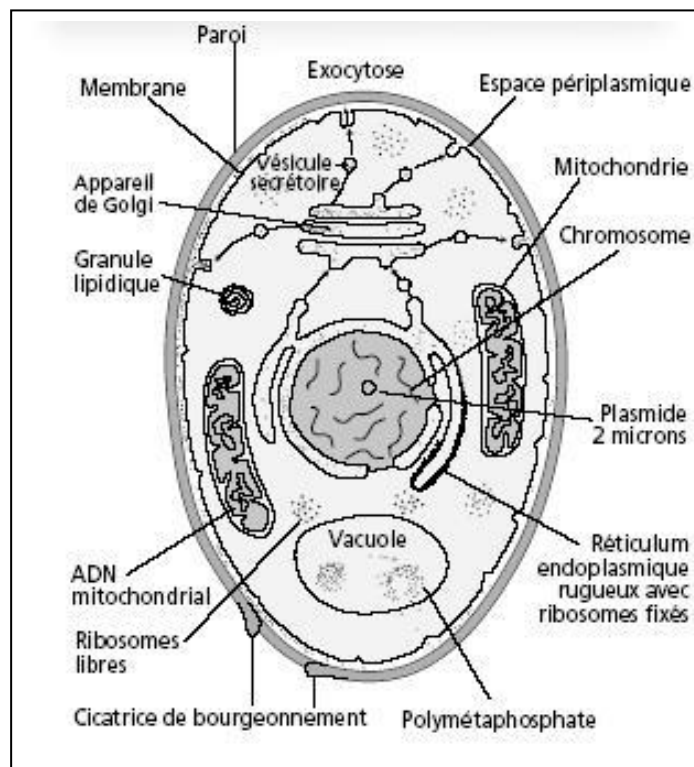


Figure 3. La cellule levurienne (Hancké, 2000)

Tableau 2 : Composants fonctionnels d'une cellule de levure idéale (Walker, 2009).

Organite	Fonction
Membrane cellulaire	Comprend la membrane plasmique qui agit comme une barrière sélectivement perméable pour le transport des molécules entrant et sortant des cellules fongiques; le périplasma contenant des protéines et des enzymes incapables de pénétrer la paroi cellulaire; la paroi cellulaire qui assure la protection et la forme et elle est impliquée dans les interactions cellule-cellule, la réception du signal et les activités enzymatiques spécialisées ; fimbriae impliqué dans la conjugaison sexuelle; et gélules pour protéger les cellules de la déshydratation et des attaques des cellules immunitaires
Le noyau	Il contient des chromosomes (complexes ADN-protéine), qui transmettent l'information génétique aux cellules filles lors de la division cellulaire, et le nucléole, site de transcription et de traitement de l'ARN ribosomique.
Mitochondrie	Responsable, dans des conditions aérobies, du métabolisme respiratoire et, dans des conditions anaérobies, de métabolisme des acides gras, des stérols et des acides aminés
Réticulum endoplasmique	Les ribosomes du réticulum endoplasmique rugueux sont les sites de biosynthèse des protéines (traduction de l'ARNm séquences de nucléotides en séquences d'acides aminés dans une chaîne polypeptidique)
Protéasome	Complexes de protéases multi-sous-unités impliqués dans la régulation du renouvellement des protéines
Appareil de Golgi et Vésicules	Système sécrétoire pour l'import (endocytose) et l'export (exocytose) des protéines
Vacuole	Réservoir intracellulaire (acides aminés, polyphosphate et ions métalliques), protéolyse, trafic de protéines et contrôle du pH intracellulaire
Peroxisomes	Se produisent dans certaines levures méthylotrophes (utilisatrices de méthanol) pour utiliser de manière oxydative les sources de carbone et d'azote (y compris la catalase et l'oxydase). Les glyoxysomes contiennent les enzymes du cycle du glyoxylate

II-2. Classification des levures :

La classification selon **Kreger-Van (1984)** qui présente en particulier, de nouveaux critères taxonomiques sont pris en considération pour permettre des études plus rigoureuses. Il s'agit d'un groupe hétérogène, qui d'un point de vue taxonomique, comprend une soixantaine de genres et près de 500 espèces (**Kreger-Van, 1984**). Les levures se divisent en 3 grandes classes :

- **Les ascomycètes** : genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque,
- **Les basidiomycètes** : genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores (chez les levures sont souvent appelés ballistospores) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote,
- **Les deutéromycètes (levures imparfaites)** : genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative.

II-3. Taxonomie :

L'espèce de levure la plus exploitée commercialement, *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger), appartient à la sous-division des champignons Ascomycotina. Résume la hiérarchie taxonomique de la levure en utilisant *S. cerevisiae* comme exemple. D'autres genres de levures sont classés dans le genre Basidiomycota (par exemple *Cryptococcus* spp. et *Rhodotorula* spp.) et Deuteromycotina (par exemple *Candida* spp. et *Brettanomyces* spp.). On peut classer les levures selon la forme comme il est montré dans le tableau 3 ci-dessous. Il existe environ 100 genres de levures reconnus (**Walker, 2009**). Le tableau ci-dessous montre la classification des levures selon la forme :

Tableau 3 : Diversité des formes de cellules de levure (Walker, 2009).

Forme de cellule	Description	Genre de levure
Ellipsoïde	Cellules de forme ovoïde	<i>Saccharomyces</i>
Cylindrique	Cellules allongées à extrémités hémisphériques	<i>Schizosaccharomyces</i>
Apiculé	En forme de citron	<i>Hanseniaspora, Saccharomycodes</i>
Ogivale	Cellule allongée arrondie à une extrémité pointue	<i>Dekkera, Brettanomyces</i>
En forme de flacon	Cellules se divisant par fission des bourgeons	<i>Pityrosporum</i>
Pseudohyphes	Chaînes de cellules de levure bourgeonnantes, qui se sont allongées sans se détacher.	Parfois trouvé dans les cellules affamées de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et fréquemment chez <i>Candida albicans</i>
Hyphe	Les cellules de levure basidiomycète poussent dans le sens de la longueur pour former des fils ramifiés ou non ramifiés ou de véritables hyphes, parfois avec des septa (parois transversales) pour constituer mycélium.	<i>Saccharomycopsis</i> spp
Di-morphique	Levures qui poussent végétativement sous forme de levure ou filamenteuse	<i>C. albicans, Saccharomycopsis fibuligera, Kluyveromyces marxianus, Malassezia furfur, Yarrowia lipolytica, Ophiostoma novo-ulmi, Sporothrix schenkii, Histoplasma capsulatum</i>
Divers	Triangulaire Incurvé Traqué Sphérique	<i>Trigonopsis</i> <i>Cryptocoque</i> <i>Stérigmatomyces</i> <i>Débaryomyces</i>

II-4. Habitats naturels des communautés de levures :

Les levures ne sont pas aussi omniprésentes dans les environnements naturels que les bactéries, mais elles peuvent toujours être isolées du sol, de l'eau, des plantes, des animaux et des insectes. L'habitat préféré de la levure est le tissu végétal (feuilles, fleurs, fruits), bien que certaines espèces aient des relations symbiotiques ou parasitaires avec les animaux. Certaines levures, en particulier *Candida albicans*, sont des pathogènes humains opportunistes. Certaines espèces de levure ont un faible potentiel hydrique (c'est-à-dire des concentrations élevées de sucre ou de sel), des températures basses (certaines levures psychrophiles sont isolées localement) et une faible disponibilité d'oxygène (par exemple, du tractus intestinal) (Walker, 2009).

II-4-1. Le sol : Le sol ne peut être qu'un réservoir pour la survie à long terme de nombreuses levures, pas un habitat. Cependant, la levure est omniprésente dans les sols cultivés (environ 10 000 cellules de levure par gramme de sol) et n'est présente que dans la couche aérobie supérieure du sol (10-15 cm). Certains genres sont isolés uniquement du sol (par exemple *Lipomyces* et *Schwanniomyces*) (Walker, 2009).

II-4-2. L'eau : La levure est présente dans les couches superficielles d'eau douce et d'eau de mer, mais pas en grande quantité (environ 1 000 cellules par litre). De nombreux isolats de levures aquatiques appartiennent au genre pigment rouge (*Rhodotorula*). *Debaryomyces hansenii* est une levure tolérante au sel qui peut se développer dans des solutions salines presque saturées (Walker, 2009).

II-4-3. L'atmosphère : On peut s'attendre à un petit nombre de cellules de levure viables par mètre cube d'air. Les genres *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporoboromyces* et *Debaryomyces* sont détectés dans les couches au-dessus de la surface du sol, distribués par les courants d'air (Walker, 2009).

II-4-4. Les plantes : L'interface entre les nutriments solubles dans les plantes (sucres) et le monde septique est une niche commune pour les levures (par exemple, la surface du raisin). La propagation des levures dans la phyllosphère est facilitée par les insectes (par exemple, la drosophile). Certaines levures sont des phytopathogènes. La présence de nombreux composés organiques en surface et dans les zones de décomposition (exsudats, fleurs, fruits, phyllosphère, rhizosphère, zones nécrotiques) crée des conditions favorables à la croissance de nombreuses levures (Walker, 2009).

II-4-5. Les animaux : Certaines levures non pathogènes se trouvent dans le tractus intestinal et la peau des animaux à sang chaud. Certaines levures (par exemple *Candida albicans*) sont pathogènes opportunistes pour les humains et les animaux. De nombreuses levures sont associées à des insectes, qui agissent comme des vecteurs importants dans la propagation naturelle de la levure (Walker, 2009).

II-4-6. Construction et environnement : Les levures sont largement répandues dans les bâtiments, par exemple *Aureobasidium pullulans* (levure noire) est courante dans les sols humides. Le papier peint naturel. Les levures bourgeonnantes sont facilement isolées des surfaces du sous-sol (tuyaux et réservoirs) (Walker, 2009).

II-5. Mode de reproduction des levures :

Le bourgeonnement est le mode de reproduction végétative le plus courant chez les levures et est typique des levures ascomycètes comme *S. cerevisiae*. Les bourgeons de levure sont initiés lorsque les cellules mères atteignent une taille cellulaire critique à un moment qui coïncide avec le début de la synthèse d'ADN. Ceci est suivi d'un affaiblissement localisé de la paroi cellulaire et cela, associé à la tension exercée par la pression de turgescence, permet l'extrusion du cytoplasme dans une zone délimitée par le nouveau matériau de paroi cellulaire (Walker, 2009). Les parois cellulaires des bourgeons mères et filles sont contiguës pendant le développement des bourgeons.

- Le bourgeonnement multilatéral est courant dans lequel les bourgeons filles émanent de différents endroits sur la surface de la cellule mère montre un bourgeonnement multilatéral chez *S. cerevisiae*. Chez *S. cerevisiae*, la taille des cellules à la division est asymétrique, les bourgeons étant plus petits que les cellules mères lorsqu'ils se séparent (Figure-). Certains genres de levures (par exemple, *Hanseniaspora* et *Saccharomyces*) subissent un bourgeonnement bipolaire, où les bourgeons sont limités aux extrémités des cellules en forme de citron. Le tissu cicatriciel sur la paroi cellulaire de la levure, connu sous le nom de cicatrices de bourgeon et de naissance, reste respectivement sur le bourgeon fille et les cellules mères. Ces cicatrices sont riches en chitine polymère et peuvent être colorées avec des colorants fluorescents (par exemple, calcofluor blanc) pour fournir des informations utiles concernant les âges chez *S. cerevisiae*, puisque le nombre de cicatrices représente le nombre de cycles de division cellulaire terminés (Walker, 2009).

- La fission est un mode de reproduction végétative caractérisé par espèces de *Schizosaccharomyces*, qui se divisent exclusivement en formant un septum cellulaire qui resserre la cellule en deux filles de taille égale (Figure-5). Dans *Sch. pombe*, qui a été largement utilisé dans les études du cycle cellulaire eucaryote, nouvellement divisé les cellules filles poussent dans le sens de la longueur de façon monopolaire pendant environ un tiers de leur nouveau cycle cellulaire. Les cellules passent ensuite à une croissance bipolaire pendant environ les trois quarts du cycle cellulaire jusqu'à ce que la mitose soit initiée à un stade de longueur cellulaire constante (Walker, 2009).
- La croissance filamenteuse se produit dans de nombreuses espèces de levures et peut être considérée comme un mode de croissance végétative alternative au bourgeonnement ou à la fission. Certaines levures présentent une propension à se développer avec de vrais hyphes initiés à partir de tubes germinatifs (par exemple, *C. albicans*), mais d'autres (y compris *S. cerevisiae*) peuvent se développer de manière pseudohyphale lorsqu'ils sont induits à le faire par des conditions défavorables. La croissance des hyphes et des pseudohyphes représente différents développements dans les levures, mais les cellules peuvent revenir à une croissance unicellulaire lors du retour à des conditions de croissance plus propices. La filamentation peut donc représenter une adaptation à butinage par les levures lorsque les nutriments sont rares (Walker, 2009).

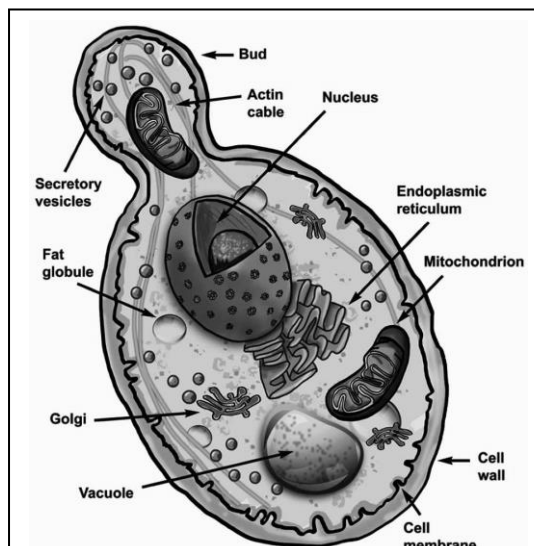


Figure 4. Bourgeonnement unipolaire d'une cellule de levure (Walker & Stewart, 2016).

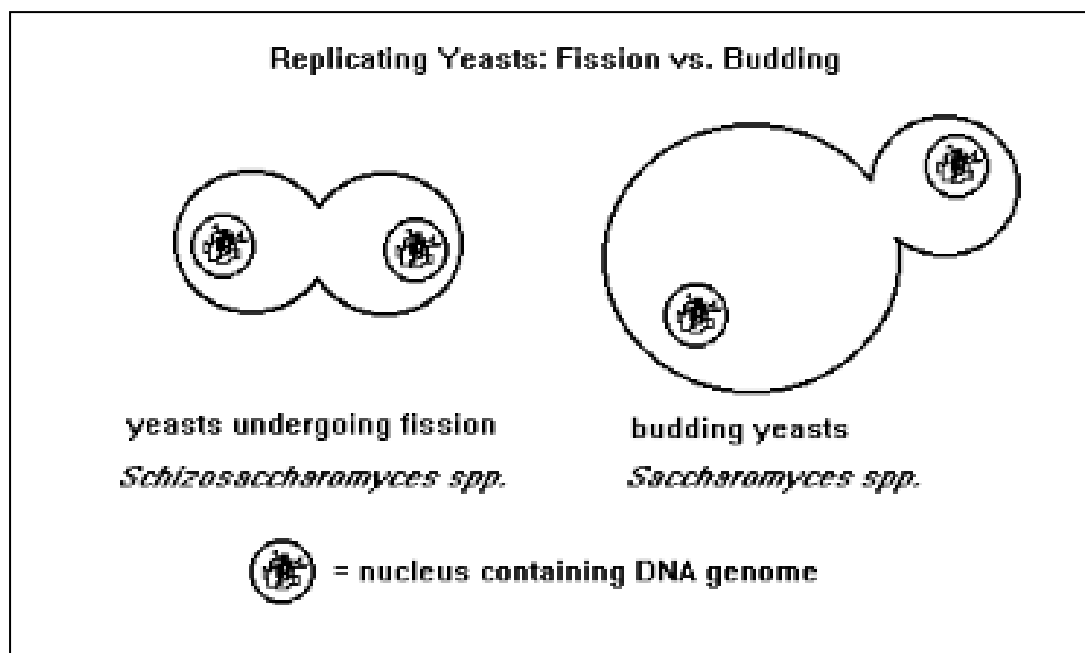


Figure 5. Les deux modes de reproductions par fission et par bourgeonnement (Abedon, 1997).

II-6. La croissance des levures :

II-6-1. Les exigences nutritives :

La croissance des levures concerne la façon dont la cellule transporte et absorbe les nutriments, puis intègre les fonctions de nombreux éléments constitutifs dans la cellule pour gagner de la masse et éventuellement se diviser. La levure s'est avérée inestimable pour déchiffrer les principaux éléments régulateurs du cycle cellulaire eucaryote, et des études avec la levure germinale *S. cerevisiae* et la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* ont démontré le contrôle du cycle cellulaire (Walker, 2009). Les cellules de levure ont besoin de macronutriments (sources de carbone, d'azote, d'oxygène, de soufre, de phosphore, de potassium et magnésium) au niveau milli-molaire dans les milieux de croissance, et ils nécessitent des oligo-éléments (par exemple, Ca, Cu, Fe, Mn, et Zn) au niveau micro-molaire. Les facteurs de croissance sont organiques composés nécessaires à de très faibles concentrations pour des rôles catalytiques ou structuraux spécifiques dans la levure, mais qui ne sont pas utilisés comme source d'énergie. Les facteurs de croissance des levures comprennent les vitamines, qui remplissent des fonctions vitales en tant que composants des coenzymes ; purines et pyrimidines ; les nucléosides et les nucléotides ; acides aminés ; Les

acides gras ; les stérols ; et autres divers composés (par exemple, les polyamines et la choline). Les besoins en facteurs de croissance varient d'une levure à l'autre, mais lorsqu'une espèce de levure est dit avoir un besoin en facteur de croissance, cela indique que l'espèce ne peut pas synthétiser le facteur particulier, entraînant le ralentissement de la croissance sans son ajout au milieu de culture (Walker, 2009).

II-6-2. Les Exigences physiques :

La plupart des espèces de levure poussent dans des environnements chauds, maigres, sucrés, acides et aérobies. La plupart des levures de laboratoire et industrielles (par exemple, les souches de *S. cerevisiae*) poussent mieux à 20-30 °C. La température minimale pour la croissance des levures est d'environ 20°C, et la température maximale est d'environ 50°C. Les levures ont besoin d'eau à haute concentration pour leur croissance et métabolisme. Plusieurs levures de détérioration des aliments (par exemple, *Zygosaccharomyces* spp.) sont capables de résister aux conditions à faible potentiel hydrique (c'est-à-dire à fortes concentrations de sucre ou de sel), et ces levures sont appelées osmotolérantes ou xérotolérant (Walker, 2009).

La plupart des levures poussent très bien entre pH 4,5 et 6,5. Les milieux acidifiés avec des acides organiques (tels que l'acide acétique et l'acide lactique) inhibent davantage la croissance des levures que les milieux acidifiés avec des acides minéraux (tels que l'acide chlorhydrique). La plupart des levures sont aérobies. En plus de fournir des accepteurs d'électrons terminaux dans la respiration, la levure se développe généralement bien dans des conditions totalement anaérobies car l'oxygène est nécessaire comme facteur de croissance pour la biosynthèse des acides gras membranaires et des stérols. Les levures sont classées selon leurs caractéristiques de fermentation et leur réponse de croissance à la disponibilité en oxygène (Walker, 2009).

II-7. Les principaux métabolismes des levures :

II-7-1. Source de carbone : Les sucres sont largement utilisés par les levures. *Saccharomyces cerevisiae* peut bien se développer sur le glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et maltose. Ces sucres sont également facilement fermentés en éthanol et en dioxyde de carbone par *S. cerevisiae*, mais d'autres substrats de carbone tels que l'éthanol, le glycérol et l'acétate peuvent être respiré par *S. cerevisiae* uniquement en présence d'oxygène. Certaines levures (par exemple, *Pichia stipitis* et *Candida shehatae*) peuvent utiliser des sucres pentoses à cinq carbones tels que le D-xylose et le L-arabinose comme substrats de croissance et de fermentation. Quelques levures amylolytiques (par exemple,

Saccharomyces diastaticus et *Schwanniomyces occidentalis*) qui peuvent utiliser l'amidon existant dans le milieu de croissance, et plusieurs levures oléagineuses (ex. *Candida tropicalis* et *Yarrowia lipolytica*) peuvent se développer sur des hydrocarbures, tels que des alcanes à chaîne droite dans la gamme C10-C20. Plusieurs levures méthylotrophes (par exemple, *Hansenula polymorpha* et *Pichia pastoris*) peuvent très bien se développer sur le méthanol comme seule source de carbone et d'énergie, et ces levures ont un potentiel industriel dans la production de protéines recombinantes utilisant des gènes utilisant le méthanol comme promoteurs (Walker, 2009). Les principaux devenir métaboliques des sucres dans les levures sont les voies dissimulatrices de la fermentation, de la respiration et les voies assimilatrices de gluconéogenèse et biosynthèse des glucides. Les levures dites fermentaires sont capables d'utiliser des substrats organiques (sucres) en anaérobiose comme donneurs d'électrons, accepteurs d'électrons et sources de carbone.

II-7-2. Source d'azote :

Bien que les levures ne puissent pas fixer l'azote moléculaire, les sources simples d'azote inorganique telles que les sels d'ammonium sont largement utilisées. Le sulfate d'ammonium est un nutriment dans les milieux de croissance de levure car il fournit une source d'azote et de soufre assimilables. Quelques levures peuvent également se développer sur le nitrate comme source d'azote, et, s'il en est capable, peut également utiliser des concentrations sub-toxiques de nitrite. Une variété de composés azotés organiques (acides aminés, peptides, purines, pyrimidines et amines) peut également assurer les besoins en azote de la cellule de levure. La glutamine et les acides aspartiques sont facilement désaminés par les levures et agissent donc comme une bonne source d'azote (Walker, 2009).

La levure stocke également des quantités relativement importantes d'acides aminés dans les vacuoles, y compris l'arginine. Les ions ammonium peuvent être directement assimilés au glutamate et à la glutamine qui agissent comme précurseurs pour la biosynthèse d'autres acides aminés. Le mode exact d'assimilation de l'ammonium par la levure dépend principalement de la concentration des ions ammonium disponibles et du pool intracellulaire d'acides aminés. Les acides aminés peuvent être dissimilé (par décarboxylation, transamination ou fermentation) pour produire de l'ammonium et du glutamate, ou ils peuvent être directement assimilés à des protéines (Walker, 2009).

II-8. Les *Saccharomyces* :

Saccharomyces cerevisiae est un champignon unicellulaire (Figure-6), possédant un ADN génomique nucléaire de 12068 kilobases (kb) organisés en 16 chromosomes. Son génome a été entièrement séquencé et contenait environ 6000 gènes, dont 5570 sont prédit être des gènes codant pour des protéines. Des analyses bio-informatiques ont révélé qu'un certain nombre de gènes codant pour des protéines sont d'origine étrangère résultat d'un transfert de gène latéral, Ces gènes, qui sont entrés horizontalement dans le génome de *S. cerevisiae*, sont d'origine procaryote ou eucaryote. Cela a d'abord été une surprise, en raison de son style nutritionnel osmotrophique et présence de parois cellulaires robustes, de membranes cellulaires et intracellulaires. En ce qui concerne la génomique des éléments extra chromosomiques de *S. cerevisiae*, toutes les souches contiennent bien sûr molécules d'ADN mitochondrial, mais souvent de tailles différentes, La plus grande version de l'ADNmt a une longueur d'environ 85780 bps. De plus, la plupart des souches de *S. cerevisiae* hébergent dans leur noyau un élément génétique d'ADN extra-chromosomique distinct appelé cercle de 2 μ m. Cet élément d'ADN double brin a une longueur typique de 6318 bps et un nombre de copies d'environ 60 copies par cellule. Il est considéré comme un « ADN égoïste » et n'a pratiquement aucune conséquence phénotypique pour son hôte, à l'exception d'une légère réduction du taux de croissance de l'hôte (Parapouli et al., 2020).

II-8-1. Les types de *Saccharomyces* :

II-8-1-1. *Saccharomyces boulardi* : une levure brevetée, le seul probiotique de levure dont l'efficacité a été prouvée dans des études (Figure-6). Elle est utilisée dans de nombreux pays comme agent préventif et thérapeutique pour les diarrhées et d'autres troubles gastro-intestinaux causés par l'administration d'agent antimicrobien (Czerucka et al., 2007).

II-8-1-2. *Saccharomyces pastorianus* : ce groupe d'organismes à bénéficié à la fois de la duplication du génome entier dans sa lignée ancestrale et de l'événement d'hybridation ultérieur entre *S. cerevisiae* et *S. eubayanus*, résultant en une forte capacité de fermentation et une bonne capacité d'utilisation du maltose et du maltotriose (Gibson et liti, 2014). C'est une espèce de levures utilisée pour produire de bière de type lager, la fermentation dont elle nécessite une très basse température (Figure-7) (Stewart, 2014).

II-8-1-3. *Saccharomyces uvarum* : une espèce du genre *Saccharomyces* considéré comme sœur jumelle de *S. cerevisiae* par les taxonomistes (Figure-7). Il s'agit d'une vrai *S. bayanus*, souvent utilisées pour la reprise de fermentation et encore désignées à tort sous le terme de *S. bayanus* (Delaherche et al., 2010). Elle est impliquée dans la production de vin, de bière et de cidre. Le cidre est produit sans addition de microorganisme mais seulement à partir de la flore naturelle de la pomme. Il fermente le glucose mélibiose et du glycéraldéhyde, active à température 4 à 10 °C.

II-8-1-4. *Saccharomyces florentinus* : connue auparavant sous le nom de *S. pyriformis*, un composant de la plante de bière au gingembre utilisée dans la fabrication de la bière au gingembre traditionnelle.

II-8-1-5. *Saccharomyces paradoxus* : l'espèce connu la plus proche de *S. cerevisiae* une espèce sauvage son absence du système de fermentation même entant que contaminant est intéressant compte tenu qu'il s'agit d'une *Saccharomyces* les plus abondantes en Europe et en Amérique u nord se trouve occasionnellement sur les raisins de vigne (Nikulin et al., 2020).

L'intérêt industriel et scientifique pour le processus de fermentation a tendance à obscurcir le fait que les levures produisent un grand nombre substances utiles autres que l'alcool et gaz carbonique. Comme on pouvait s'y attendre, les levures sont une source primaire des enzymes (Ros, 1960).

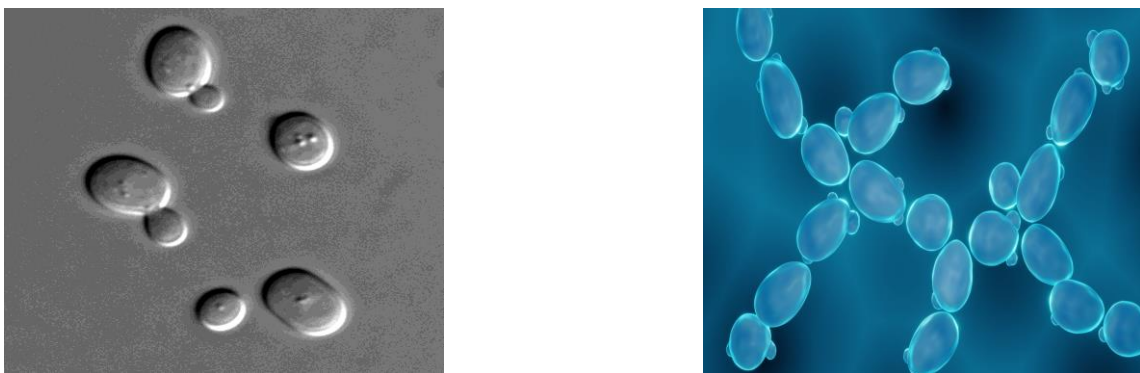


Figure 6. *Saccharomyces cerevisiae* (à gauche) et *Saccharomyces boulardii* (à droite)

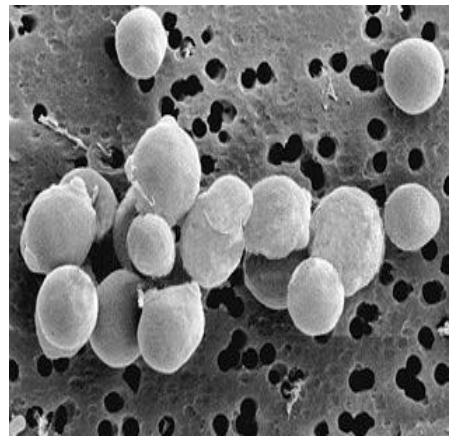
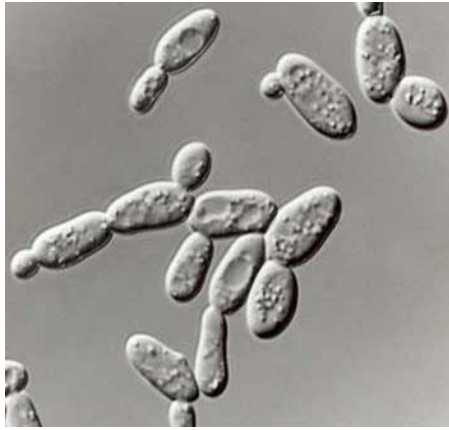


Figure 7. *Saccharomyces pastorianus* (à gauche) et *Saccharomyces uvarum* (à droite)

Chapitre III : Utilisation des *Saccharomyces* spp.

III-1. En technologie :

III-1-1. Pain :

La fabrication du pain, depuis la plus Haute Antiquité, est voisine de celle de la bière. D'abord galette plate non fermentée réalisée avec une bouillie de grains grossièrement broyés et vraisemblablement cuite sur des pierres plates chaudes, le pain constitue la base de l'alimentation depuis sept à huit mille ans. Les Egyptiens utilisaient probablement de la vieille pâte dans laquelle s'étaient multipliées des levures sauvages et des ferments lactiques. D'autres procédés se sont développés depuis : la levure pour la boulangerie néerlandaise provenait d'un sous-produit libéré lors du brassage de la bière et plus tard également lors de la distillerie du blé (**Hencké, 2000**).

La levure de boulangerie est caractérisée par le fait qu'elle est composée de cellules vivantes de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* : 1g de levure fraîche contient environ 10^{10} cellules. Le « pain traditionnel » correspond au produit résultant de la cuisson dans un four d'une pâte pétrie et composée uniquement de farines panifiables (froment, seigle), en mélange ou non, d'eau potable et de sel de cuisine. Cette pâte est fermentée par des agents de fermentation autorisés (Figure-8), employés simultanément ou non : levure de panification, levain. On ajoute éventuellement des additifs ou adjuvants dont l'emploi est limité et autorisé (**Hencké, 2000**).



Figure 8. La levure en panification.

Tableau 4. Produits industriels produits par les levures (Walker, 2009).

PRODUIT DE BASE	EXEMPLE
BREUVAGES	Boissons alcoolisées potables : Bière, vin, cidre, saké et whisky, rhum, gin, vodka.
DE LA NOURRITURE ET L'ALIMENTATION ANIMALE	Levure de boulanger, extraits de levure, levure fourragère, facteur de croissance du bétail et pigments alimentaires
PRODUITS CHIMIQUES	Carburant éthanol (bioéthanol) dioxyde de carbone, glycérol et vitamines d'acide citrique ; les levures sont également utilisé comme catalyseurs bio-réducteurs dans chimie organique
ENZYMES	Invertase, inulinase, pectinase, lactase et lipase
PROTEINES RECOMBINANTS	Hormones (p. ex. insuline), vaccins viraux (p. ex. vaccin contre l'hépatite B), anticorps (p. ex. IgE récepteur), facteurs de croissance (par exemple, tumeur facteur de nécrose), interférons (p. ex., leucocyte interféron-), protéines sanguines (p. ex., albumine sérique) et des enzymes (p. ex., gastrique lipase et chymosine)

III-1-2. Les boissons alcoolisées :

III-1-1-1. La bière :

La bière est obtenue par fermentation alcoolique d'un moût (jus sucré) fabriqué par macération de malt d'orge. La fermentation est obtenue spontanément par *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. carlbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe* ou le plus souvent par ensemencement massif du moût stérile par des souches pures sélectionnées et conservées par repiquage. La levure de bière est un sous-produit précieux de l'industrie brassicole. Il est utilisé à des fins alimentaires, pour sa richesse en vitamine de groupe B, de protéines et de certains minéraux. La levure de bière destinée à la consommation humaine est lavée pour

éliminer la saveur du houblon. De grandes quantités de levure de bière ont été utilisées dans des produits alimentaires, tels que des soupes en tant que comprimés de levure de bière (Dunn, 1958).



Figure 9. Brasserie en action.

III-1-1-2. Le vin :

Au moment où les raisins mûrissent, le sucre est déjà stocké sous forme de sucre, glucose et fructose, et acide. La fermentation se fait par des levures de genre *Saccharomyces cerevisiae*, à noter que la fermentation malolactique, qui réduit l'acidité du moût en transformant l'acide malique en acide lactique (moins acide) et en CO₂, est de nature bactérienne (Hencké, 2000). Ils existent trois types de vinification :

En vinification rouge : le raisin entier est récupéré alors qu'en « vinification blanche », les éléments solides (pépins, rafle) sont retenus par pressurage (Hencké, 2000).

En blanc : fermentation du seul jus de raisin, c'est-à-dire sans macération des parties solides de la grappe. On ne doit pas s'étonner de fabriquer du vin blanc à partir de raisins noirs car la

plupart des pigments sont contenus dans la pellicule qui enveloppe la pulpe incolore. Quant aux vins rosés. Leur macération est très courte (**Hencké, 2000**).

En rose : intermédiaire entre le vin obtenu sans macération et le vin de macération. Ils sont obtenus soit par vinification en blanc de raisins rouges, soit par macération partielle, dite « par saignée ». Ces derniers ont le nom de « clarets, vins de café, vins d'une nuit » (**Hencké, 2000**).



Figure 10. La levure en vinification.

III-1-1-3. Le champagne :

Le champagne est préparé à partir d'un vin de base auquel on ajoute du sucre de canne ou de betterave. L'élaboration du Champagne est caractérisée par l'aptitude des souches de *S. cerevisiae* ou *S. bayanus* à réaliser une seconde fermentation à 10- 12°C pour amener le liquide de 11 ,5° d'alcool. Ces souches doivent supporter le remuage qui consiste à faire glisser le dépôt dans le col de la bouteille. La boisson obtenue a été le siège de 3 fermentations : alcoolique, malolactique et enfin, une dernière fermentation alcoolique, communément appelée « champagnisation » ou « prise de mousse » (**Hencké, 2000**).

III-1-1-4. Le cidre :

C'est une boisson résultant de la fermentation d'un moût sucré obtenu à partir de pommes. La microbiologie du cidre est assez proche de celle du vin : la fermentation par les levures transforme les sucres du jus en alcool. On trouve des levures apiculées (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*) des levures elliptiques (*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoidus* et *S. uvarum*), qui constituent la flore normale des pommes. Initialement, le cidre obtenu selon la méthode rurale résultait d'une fermentation lente et partielle du moût à partir de la microflore sauvage présente sur les pommes (Hencké, 2000).

III-1-1-5. Saké :

Le Saké est une boisson traditionnelle, consommée depuis longtemps au Japon. Boisson translucide et sans couleur (ou un peu jaune), il contient en moyenne 15 % d'alcool. La fabrication du saké ressemble plus à celle de la bière qu'à celle du vin, car la levure doit d'abord disposer d'assez de sucre pour créer l'alcool ; en effet, la levure de bière, ou levure de saké, ne peut faire naître l'alcool à partir de l'amidon (Hencké, 2000).

III-2. Utilisation probiotique :

III-2-1. Utilisation en médecine :

La plupart de la levure est bénéfique pour la vie humaine. Cependant, certaines levures sont des pathogènes opportunistes pour l'homme. Les infections fongiques causées par *C. albicans*, collectivement appelées candidose (candidose), sont les infections à levures opportunistes les plus courantes. Il existe de nombreux facteurs prédisposant aux infections à levures, mais les personnes dont le système immunitaire est affaibli semblent être particulièrement sensibles à la candidose. Les infections à *C. albicans* chez les patients atteints du SIDA mettent souvent la vie en danger. Les aspects médicaux bénéfiques de la levure ont été démontrés dans l'administration de nouvelles thérapies humaines par la technologie de l'ADN de levure recombinante. Les levures sont également d'une grande valeur en tant que modèles expérimentaux dans la recherche biomédicale, en particulier dans les domaines de l'oncologie, de la pharmacologie, de la toxicologie, de la virologie et de la génétique humaine (Walker, 2009).

III-2-2. Utilisation en alimentation animal :

De nombreuses levures et produits contenant de la levure sont fabriqués, commercialisés et utilisés en nutrition animale comme sources de nutriments, de probiotiques, de nutriments ou de fonctions nutritionnelles. Un certain nombre d'études scientifiques ont montré que la levure et ses dérivés peuvent avoir un effet positif sur la capacité de croissance et la santé des animaux, en particulier lorsque les animaux sont gardés dans de mauvaises conditions sanitaires ou souffrent de maladies (**Pang et al., 2022**).

II-2-2-2. Levure probiotique pour volaille :

Les communautés microbiennes du tube digestif des poulets sont essentielles pour l'homéostasie et le métabolisme de l'hôte, et affectent la fonction physiologique et la santé des poulets. Ils jouent un rôle important dans l'alimentation du système digestif, l'inhibition des agents pathogènes, l'inhibition des interactions entre les agents pathogènes et l'interaction avec le système immunitaire associé à l'intestin. La principale défense contre les pathogènes entériques dans le tractus gastro-intestinal est le microbiote intestinal. Les troubles de l'interaction du microbiote intestinal avec l'hôte jouent un rôle important dans le développement des maladies intestinales. Il y avait des changements significatifs dans la flore cœcale des poulets infectés par les espèces *Clostridium perfringens* et *Salmonella*. Pour la volaille, les avantages des suppléments à base de probiotiques à base de levure comprennent l'amélioration de l'efficacité de la production de poulets de chair et la réduction des pathogènes entériques (*Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *C. Destruction d'E. coli*) (**Pang et al., 2022**).

III-2-2-3. Levure probiotique pour ruminants :

La supplémentation des bovins de boucherie et laitiers avec *S. cerevisiae* améliore non seulement les performances et la fonction immunitaire, mais réduit également l'excrétion d'azote et améliore la qualité du lait. De plus, *S. cerevisiae* peut améliorer l'environnement microbien, améliorer la fonction de fermentation du rumen, stabiliser le pH du rumen, favoriser le métabolisme des bactéries lactiques, augmenter l'activité des enzymes fibrinolytiques du rumen et favoriser les substances de dégradation des fibres (**Pang et al., 2022**). Le diagramme ci-dessous schématise d'autres utilisations industrielles de levures

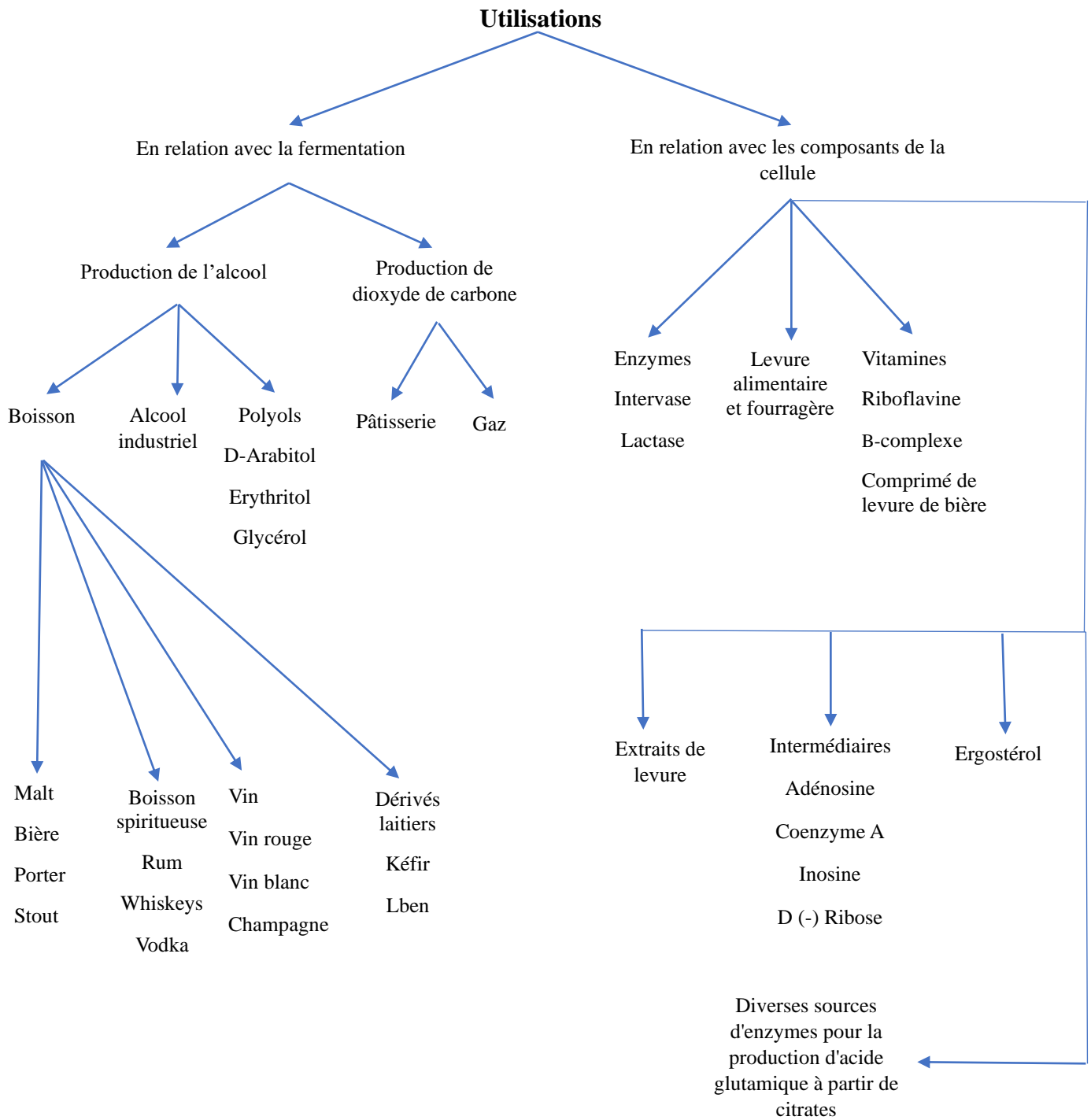


Figure 11. Diagramme de différentes voies d'utilisation des levures.

Chapitre IV : les probiotiques

IV-1. Définition des probiotiques :

Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et l'Organisation mondiale de la santé, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui confèrent un avantage pour la santé à l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante. En particulier, les souches appartenant à *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, qui sont les souches prédominantes et groupes sous-dominants du microbiote gastro-intestinal, respectivement, sont les bactéries probiotiques les plus largement utilisées et sont incluses dans de nombreux aliments fonctionnels et compléments alimentaires. La levure *Saccharomyces boulardii* a également été démontré qu'il a des effets bénéfiques sur la santé humaine (**Bermudez-Brito et al., 2012**).

IV-2. Les levures probiotiques :

Malgré le nombre croissant d'études effectuées au sujet des probiotiques bactériens, la vaste majorité des probiotiques utilisés notamment pour les animaux sont constitués de préparations composées de levures soit *Aspergillus oryzae* et/ou *Saccharomyces cerevisiae* (sous-type *boulardii*). Le *S. boulardii* est une levure ubiquitaire qui se retrouve dans les plantes, les fruits et le sol. Elle est utilisée dans le processus de fermentation de la bière, du cidre et du vin. A ce jour, il n'existe pas de preuve que *S. boulardii* fasse partie de la flore endogène (**Graf et Sarasin, 2007**). *Saccharomyces cerevisiae*, var *boulardii* est une levure d'origine naturelle, non génétiquement modifiée, isolée à partir de l'écorce de lychees en Indochine. *Saccharomyces boulardii* est une espèce voisine de *Saccharomyces cerevisiae* dont elle se distingue par différentes caractéristiques taxonomiques, métaboliques et génétiques (**Cordonnier, 2015**).

Tableau 5. Sources de souches probiotiques courantes (Lynne V. McFarland, 2015).

Souche	Premier isolement	Première action apparente
<i>Bifidobacteria bifidum</i>	Henry Tissier isolé à partir d'un échantillon de selles de nourrisson	Bactéries pathogènes déplacées
<i>Clostridium butyricum 588</i>	Isolé du sol en 1963	Modification de la microflore intestinale normale
<i>Lactobacillus acidophilus lb</i>	Isolé de l'intestin humain	Diarrhée
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	En 1905, isolé du lait fermenté par Stamen Grigorov	Fermentation du yaourt
<i>Lactobacillus casei subsp Shirot</i>	Isolé des matières fécales humaines. Minoru Shiota l'a découvert en 1935	Résiste à la colonisation pathogène
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Isolée du colon humain	Réduit l'inflammation
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	En 1983, isolé à partir d'excréments humains sains par Goldin et Gorbach	Améliorer la flore colique normale
<i>L. helveticus</i>	En 1990, isolé du démarreur de lait acidophilus	Guérison de l'ulcère peptique
<i>Saccharomyces boulardii</i>	En 1920, Henri Boulard isole la levure à la surface d'un fruit de litchi	Empêche cholera

IV-3. Le rôle des probiotiques :

➤ Effet luminal

L'effet luminal décrit le rôle de la levure dans la lumière, ou l'espace à l'intérieur de l'intestin, par opposition à la paroi de l'intestin. La levure probiotique peut contrôler la

croissance d'autres microbes dans l'intestin ou limiter leur attachement aux cellules intestinales grâce à une liaison spécifique. En effet, la paroi cellulaire de la levure *S. boulardii* agit comme un leurre et attire d'autres micro-organismes opportunistes à sa surface pour finalement les extraire lorsqu'elle sort du corps par les selles (Czerucka, 2019). *S. boulardii* est également capable de sécréter des protéines spécifiques qui inactivent les métabolites des bactéries opportunistes (McFarland, 2010).

➤ Action trophique

Les levures probiotiques aident au bon fonctionnement des cellules épithéliales intestinales, également appelées entérocytes. La levure probiotique assure l'intégrité de la barrière intestinale : des jonctions serrées entre les cellules intestinales améliorent l'imperméabilité de la barrière intestinale, séparant le reste du corps de l'intestin ; en tant qu'allié, *S. boulardii* préserve et renforce ces jonctions serrées (Terciolo 2019).

De plus, la levure maintient une microflore saine en protégeant le métabolisme et l'écosystème de la muqueuse intestinale en aidant le corps à absorber les nutriments et participe à l'amélioration de la libération d'enzymes spécifiques (Pais 2020). Elle augmente le niveau d'acides gras à chaîne courte (AGCC) rétablissant la fermentation et l'absorption normales du côlon, ces AGCC étant la principale source d'énergie pour les entérocytes. Enfin, elle montre également une activité antioxydante en améliorant la chélation du fer (Gaisawat, 2019).

➤ Modulation de l'immunité

Les levures probiotiques ont un fort impact sur la réponse immunitaire en stimulant et en modulant l'immunité. Elles améliorent les fonctions immunologiques et augmente les paramètres immunitaires spécifiques tels que les niveaux d'immunoglobulines (Qamar, 2001). Enfin, des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré son implication dans la modulation des voies de signalisation immunitaire afin d'assurer le bon équilibre de l'immunité (Kelesidis, 2012, Pais, 2020).

IV-4. Potentiel probiotique des levures :

En tolérant les conditions rencontrées dans l'environnement digestif humain et en exerçant une action antagoniste vis-à-vis de bactéries pathogènes, plusieurs espèces de levures ont montré des propriétés probiotiques intéressantes : *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lodderae* et *Saccharomyces cerevisiae*. L'effet antagoniste des levures vis-à-

vis des micro-organismes pathogènes a été attribué principalement à la compétition pour les éléments nutritifs, des changements de pH dans le milieu à la suite d'une augmentation de la production d'acides organiques par le microbiote intestinal, la production d'éthanol et la sécrétion et la libération de composés antimicrobiens comme des composés organiques volatils (**Cordonnier, 2015**).

Par ailleurs, les probiotiques à base de levures peuvent interagir positivement avec des probiotiques bactériens en améliorant leur survie dans l'environnement digestif et en stimulant leur croissance. En effet, cette synergie pourrait être attribuée à la production par les levures de nutriments tels que des peptides, des acides aminés et/ou des vitamines. De plus, la paroi cellulaire des levures est principalement composée de glucanes, de mannanes et de chitines. Ces composants peuvent jouer un rôle dans les phénomènes d'adhésion permettant d'augmenter la survie des bactéries probiotiques dans l'environnement digestif (**Cordonnier, 2015**).

IV-5. Les critères de sélection des probiotiques :

Survie de la cible ou interaction avec le système hôte, activité anti-pathogène et problèmes de fabrication. Les cibles sont le tractus intestinal, les surfaces cutanées, les cavités dentaires ou les voies urinaires. La plupart des probiotiques sont pris par voie orale pour cibler l'organe (tractus intestinal), ils doivent donc survivre de la bouche au côlon. Les souches probiotiques sont testées pour leur résistance aux acides gastriques et biliaires (**Suvarna et Boby, 2005**). La souche probiotique est sélectionnée pour plusieurs critères cités dans le tableau 6.

IV-5-1. Critères de sécurités :

IV-5-1-1. Identification de la souche :

Comme les effets des probiotiques sont spécifiques à la souche, une caractérisation précise des souches utilisées est nécessaire. La détermination taxonomique des souches probiotiques potentielles est donc une étape essentielle (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-1-2. Innocuité :

Les micro-organismes probiotiques doivent être totalement inoffensifs pour les consommateurs, c'est-à-dire qu'il est non toxique et non pathogène. Cette norme de sécurité semble évidente, mais en testant tous les effets secondaires possibles (résistance aux

antibiotiques, activité métabolique nocive, production de toxines, potentiel d'infection, activité hémolytique) (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-1-3. Origine :

De nombreux scientifiques ont suggéré qu'une souche probiotique isolée du tractus digestif humain serait plus sécuritaire et plus efficace pour une utilisation chez l'Homme. Ainsi, les souches probiotiques d'origine humaine sont considérées comme les plus compatibles avec le tractus intestinal humain. Mais elles peuvent également être d'origine animale, alimentaire, minérale ou végétale, du moment qu'aucune donnée scientifique n'atteste de leur dangerosité pour la santé humaine (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-2. Critères fonctionnels :

Les exigences fonctionnelles des probiotiques sont établies à l'aide de tests *in vitro* qui se réfèrent à des propriétés bactériennes et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-2-1. Survie au cours du transit digestif :

Pour espérer être efficaces jusqu'à leur site d'action, à savoir au niveau intestinal, les probiotiques ingérés doivent être vivants dans le tube digestif et donc survivre durant le transit. Au niveau de l'estomac, la survie des probiotiques dépend de leur capacité à tolérer le pH faible du suc gastrique. Ensuite, au niveau de l'intestin grêle, le pourcentage de survie des probiotiques est influencé par la sécrétion de la bile, Les microorganismes qui survivent aux conditions acides de l'estomac doivent alors faire face à l'action détergente des sels biliaires libérés dans le duodénum (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-2-2. Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus :

L'adhésion permet d'augmenter le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin car ils résistent mieux aux mouvements péristaltiques intestinaux. Il est généralement admis que l'effet probiotique aura d'autant plus de chance d'être maximal que le microorganisme vivant séjournera longtemps dans le tube digestif. Par ailleurs, plusieurs effets bénéfiques des probiotiques semblent directement liés à la capacité d'adhésion. En effet, l'adhésion serait importante pour l'immun-modulation car les probiotiques adhérents sont en contact direct avec les cellules immunes épithéliales. De plus, l'adhésion des probiotiques permettrait de prévenir l'implantation de pathogènes sur les cellules épithéliales intestinales par des mécanismes de compétition (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-2-3. Colonisation :

Il est maintenant démontré que les probiotiques ne s'implantent pas, ils transitent dans le tube digestif jusque dans les selles, parfois sans avoir adhéré ou s'être multipliés. Les probiotiques colonisent donc temporairement le tractus digestif et font ainsi partie du microbiote allochtone. Leur persistance est plus ou moins longue, de deux à vingt jours en moyenne selon les souches sélectionnées. Les souches ayant une durée de persistance élevée sont à privilégier (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-2-4. Activité antimicrobienne :

Les microorganismes probiotiques doivent essentiellement maintenir de bonnes conditions sanitaires au sein du tube digestif. Il est donc important qu'ils soient capables d'inhiber le développement des germes indésirables. La présence d'activités antimicrobiennes peut être démontrée *in vitro* par un challenge-test. Cette technique consiste à inoculer une concentration connue de germes microbiens dans la préparation de probiotiques à tester, puis à dénombrer ces germes à différentes échéances. Si la présence d'activités antimicrobiennes n'est pas démontrée *in vitro*, les chances de colonisation des souches probiotiques ainsi que leur efficacité *in vivo* semblent considérablement diminuées. Cependant, même si les résultats obtenus *in vitro* sont favorables, ils sont difficilement extrapolables *in vivo* car les mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-3. Critères technologiques :

Les caractéristiques des souches ne doivent pas être altérées durant les procédés de production, de conservation et de distribution du probiotique.

IV-5-3-1. Viabilité et stabilité des microorganismes :

Les probiotiques peuvent être présents dans les produits laitiers ou certains aliments ou médicaments sous forme de gélules, de solution buvable ou de poudre dont fabrication nécessite la mise en œuvre de procédés souvent néfastes pour la survie des microorganismes probiotiques tels que l'atomisation, la centrifugation ou la lyophilisation. La stabilité physique et génétique des probiotiques, ainsi que toutes les propriétés nécessaires pour exercer leurs bienfaits sur la santé doivent être maintenues durant les processus de transformation, de manipulation et de stockage du produit. Des contrôles doivent donc être effectués à différentes étapes (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-3-2. Conservation :

Les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation du produit et fournies en dosage approprié jusqu'à la date de péremption. A ce propos, des études doivent être menées pour déterminer la date limite d'utilisation de chaque produit probiotique sans diminution ou perte de leurs propriétés bénéfiques (**Piquepaille, 2013**).

IV-5-3-3. Propriétés organoleptiques :

Les produits probiotiques doivent être attrayants pour les consommateurs. Il possède d'excellentes propriétés organoleptiques, notamment au niveau gustatif (**Piquepaille, 2013**).

Tableau 6. Principaux critères de sélection des souches probiotiques (**Piquepaille, 2013**).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none">○ Identification taxonomique précise○ Souche caractérisée par des méthodes phénotypiques et génotypiques○ Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement○ Historique de non pathogénicité (statut QSP ou GRAS)○ Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques○ Pas de dé-conjugaison excessive des sels biliaries○ Souche d'origine humaine de préférence
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none">○ Tolérance à l'acidité gastrique, à la bile et aux enzymes digestives○ Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus et persistance dans le tractus digestif○ Antagonisme vis-à-vis des pathogènes, production de substances antimicrobiennes et immunomodulation○ Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé (efficacité documentée et prouvée dans des études in vitro et in vivo contrôlées chez l'Homme)
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none">○ Viabilité et stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini○ Conservation des propriétés probiotiques après production○ Bonnes propriétés organoleptiques

IV-6. Risques des probiotiques :

Les informations disponibles sur les risques des probiotiques sont rares, tout comme les preuves concrètes limitées des avantages. Apparemment, les probiotiques peuvent avoir les effets secondaires suivants (**Doron & Snyderman, 2015**) : Douleurs abdominales légères, ballonnements nausées, selles molles rarement, les personnes dont le système immunitaire est affaibli sont plus sensibles aux infections causées par les probiotiques. Par exemple, les personnes qui suivent une chimiothérapie ou qui prennent des médicaments qui suppriment le système immunitaire peuvent être plus sensibles aux infections liées aux probiotiques.

➤ **Diminution de l'immunité :**

Cela inclut les personnes subissant une chimiothérapie ou une radiothérapie et les personnes prenant des médicaments immunosuppresseurs pour des greffes ou des maladies auto-immunes. Par exemple, les probiotiques peuvent augmenter le risque d'infection chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli et des problèmes structurels cardiaques.

La FDA recommande d'éviter les suppléments probiotiques si vous avez des anomalies des valves cardiaques ou si vous avez subi une chirurgie de remplacement des valves cardiaques. Les personnes ayant des problèmes cardiaques structurels ou des antécédents d'endocardite peuvent présenter un risque accru d'infections des valves cardiaques (**Doron & Snyderman, 2015**)

➤ **Ligne médiane ou port**

Les probiotiques ne doivent pas être administrés aux personnes ayant des cathéters centraux ou des orifices pour l'accès intraveineux ou l'administration de médicaments, en particulier les patients non hospitalisés recevant des soins en unité de soins intensifs. On pense que l'utilisation de probiotiques dans ces groupes peut augmenter le risque d'infections graves (**Doron & Snyderman, 2015**).

➤ **Les femmes enceintes :**

Il n'y a pas suffisamment de preuves pour évaluer l'innocuité de l'utilisation des probiotiques pendant la grossesse (**Doron & Snyderman, 2015**).

➤ **Les allergies :**

Les personnes qui ont eu des réactions allergiques aux probiotiques ou à la levure ne doivent pas prendre de suppléments probiotiques (**Doron & Snyderman, 2015**)

Partie expérimentale

I- Matériel et méthodes

I-1. Objectifs : L'objectif principal de notre travail est d'une part d'isoler et identifier partiellement des levures appartenant au genre *Saccharomyces* spp. à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement et d'autre part d'étudier leurs profil probiotique en évaluant les aspects suivants :

- Assimilation des sources carbonées,
- Activité hémolytique,
- Activité protéolytique,
- Antibiorésistance,
- Activité antibactérienne.

I-2. Echantillonnage :

La matière première utilisée pour la réalisation de cette étude est le lait cru de vache collecté de l'exploitation privé de Mr. Guellouza à Laghouat. Le prélèvement était effectué en deux reprises le vendredi 27 janvier 2023 (2 L) et le samedi 28 janvier 2023 (6 L). Plus de détails est récapitulé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7 : Information sur l'échantillonnage du lait utilisé dans cette étude.

Echantillon	Date	Lieu	Quantité	Région	Stockage/T° ambiante
Lait pour la préparation de Lben / Zebda	27-janv- 2023	Exploitation privé Guellouza	2 L	Laghouat	Récipient en acier inoxydable avec couvercle
Lait pour la préparation de Jben	28-janv- 2023	Exploitation privé Guellouza	6 L	Laghouat	Récipient en acier inoxydable avec couvercle



Figure 12. L'exploitation privé de Mr. Guellouza (photographie originale 2023)

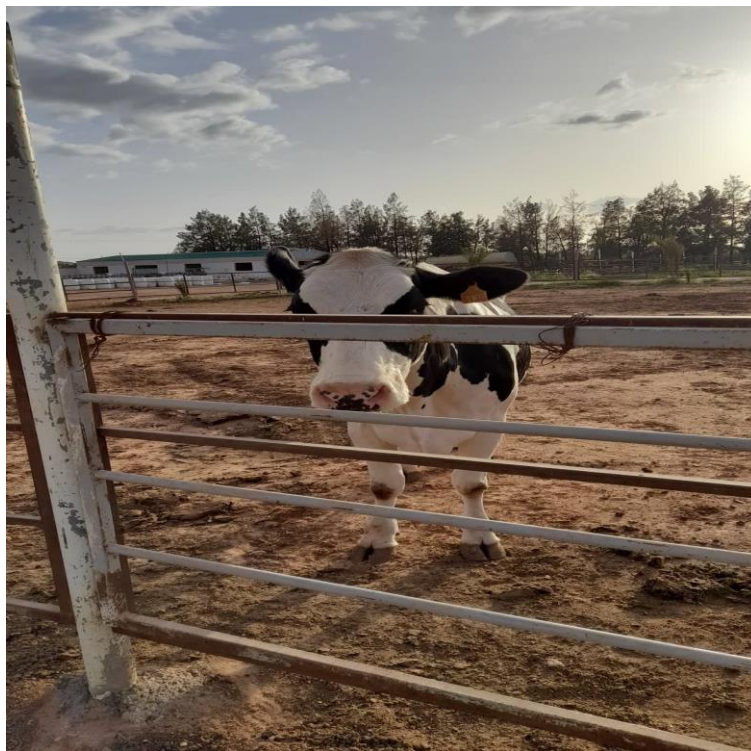


Figure 13. La vache laitière (photographie originale 2023)

I-3. Préparation de Lben :

Ce produit est fabriqué traditionnellement en collectant du lait cru et en le filtrant pour éliminer les impuretés. Puis, le lait est mis à la température ambiante pour une fermentation spontanée pendant 1 à 2 jours afin d'obtenir le LBEN (**Obodai et Dodd, 2006**), notant que cette fermentation peut être accélérée en déposant le produit dans une cuisine spécialement dans les mois froids (**Moonga et al., 2019**)

I-4. Préparation de l'échantillon de Zebda :

Tout d'abord, le lait cru est fermenté à la température ambiante pendant 24 à 72 heures pour que le lait coagule et forme un produit laitier traditionnel dit Lben. Ce dernier est placé dans un sac en cuir appelé "Chaquoa" (environ 2 L) poursuivant d'un barattage pendant 40 à 60 min jusqu'à la formation d'une matière grasse appelé « Zebda » (**Idoui et al., 2010**). Une certaine quantité d'eau (environ 10% de la quantité de lait) est ajoutée généralement chaude ou froide selon la température ambiante. La température d'assemblage est ramenée à un niveau adapté pour réunir les granules de beurre. Ce sera récupéré généralement à la main (**Tantaoui-Elaraki et al., 1983**)

I-5. Préparation de l'échantillon du Jben :

La préparation de Jben est réalisée en trois étapes :

I-5-1. La maturation :

Il consiste à incuber le lait cru à la température ambiante pendant un certain temps pour favoriser la prolifération de la flore lactique qui joue un rôle important dans l'acidification du lait (**Ouadghiri, 2009**).

I-5-2. La coagulation :

C'est une activité qui vise à faire coaguler le lait au moyen de présure. L'activité coagulante est déterminée par la force de la présure, de la température du lait et de l'acidité. Ensuite, le lait est laissé en repos à la température ambiante pendant 4 heures (**Ouadghiri, 2009**).

I-5-3. L'égouttage :

Il permet l'élimination de la majeure partie du sérum qui pénètre dans la peau de coagulum et qui va donner en quelque sorte la forme du fromage (**Ouadghiri, 2009**).

I-6. Préparation des échantillons :

L'isolement des levures est effectué à partir des échantillons de Lben Jben et Zebda. L'échantillon de Lben est divisé en deux parties dans des flacons stériles, tandis que l'échantillon de Zebda est découpé en petits morceaux, déposé dans un flacon stérile, en ajoutant de l'eau physiologique stérile à 45°C. Concernant l'échantillon de Jben, il est découpé en petits morceaux, déposé dans un flacon stérile, en additionnant de l'eau physiologique stérile à 45°C. Les trois échantillons ont été incubés dans l'étuve pendant 72h à 37°C.

I-7. Isolement des levures :

Après l'incubation des échantillons, deux méthodes d'isolement sélectif ont été utilisées. La première est réalisée sur un milieu liquide YPD bouillon (yeast 1%, peptone 2%, dextrose 2%) additionné de 10% éthanol (Fiedurek et al., 2011) à partir de 3 échantillons, 5 ml de chaque échantillon sont déposés dans des flacons stériles contenant 50 ml du milieu YPD bouillon additionné de 10% éthanol. Après 24 d'incubation, des solutions mères sont préparées avec 1 ml de chaque échantillon dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Ulacio et al., 1997). Une série de dilutions décimales sont préparées jusqu'à 10^{-3} , et chaque dilution est homogénéisée par agitation. L'ensemencement est fait en surface par étalement de 0.1 ml de chaque dilution sur le milieu sélectif YPD agar, et les boîtes pétries sont ensuite mis sous incubation à 35 °C pendant 3 jours.

La deuxième est réalisée sur un milieu solide YPD agar additionné de chloramphénicol (0.1 g/l). A partir de 3 échantillons, une série de dilutions décimales sont préparées jusqu'à 10^{-3} , en transférant 1 ml de chaque échantillon dilué dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Ulacio et al., 1997). Après homogénéisation, 0.1 ml de chaque dilution est étalé en surface sur le milieu sélectif YPD agar additionné de chloramphénicol (0.1 g/l), ensuite, les boîtes pétries sont incubées pendant 3 jours à 35 °C.

I-8. Purification et conservations :

Après incubations de 72 h à 35 °C, les colonies caractéristiques obtenues sont cultivées en milieu YPD agar par repiquages une seule fois à l'aide d'une pipette pasteur stérile selon la méthode de quadrillage qui consiste à diviser la boîte de Pétri en deux (50 % et 50 %) et diviser à nouveau la moitié en deux pour obtenir trois quadrants à 50 %, 25 % et 25 %. Ensuite les boîtes sont mises en incubation pendant 24 h à 35 °C.

I-9. Conservations des souches :

Les isolats purs obtenus sont mis en conservation dans des tubes contenant le bouillon YPD, puis incubés pendant 48 h à 35°C. Ensuite, les isolats sont conservés pour une période d'un mois maximum (Ul-Haq et al., 2002). Chaque isolat passe par des examens macroscopiques et microscopiques afin de confirmer leur appartenance au groupe de *Saccharomyces* spp.

I-10. Identification morphologique :

I-10-1. Macroscopique :

Après l'ensemencement sur YPD agar et incubation des boîtes pendant 24 h à 35 °C, une étude de l'aspect macroscopique des colonies pures de levure est réalisée afin de permettre la détermination de leurs genre *Saccharomyces*. Elle englobe (Joffine et Leyral. 2006) :

- Forme des colonies : rondes, irrégulières, régulière, punctiforme, etc.,
- Taille des colonies : par la mesure du diamètre,
- Couleur de la colonie : rose, blanche, etc.,
- Élévation : convexe, concave, plate, etc.,
- Opacité : opaque, translucide ou transparente, etc.,
- Surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée.

Les isolats ont été également identifiés sur milieu YPD liquide où l'aspect de la culture de chaque isolat est soigneusement noté :

- Présence de dépôt au fond du tube ainsi que son aspect (fin, modéré ou épais)
- La production de gaz.

I-10-2. Microscopique :

Une goutte d'eau physiologique stérile a été déposée sur lame, puis à l'aide d'une pipette pasteur stérile, une colonie a été prélevée et bien homogénéisée dans la goutte d'eau physiologique et recouverte par une lamelle pour une observation à l'état frais de la morphologie des levures vivantes. L'observation est réalisée immédiatement au microscope optique à l'objectif 40. L'observation microscopique permet de définir la forme, l'arrangement et le mode de reproduction végétative des cellules (Bourgeois et Leveau, 1980).

I-11. Assimilation des sources carbonées (Fermentation des sucres) :

Pour étudier l'assimilation des sucres par les levures, les 7 sucres suivants ont été testés : Sacrose, Galactose, Lactose, Fructose, Maltose, Dextrose et Arabinose. Une série de tubes de 15 ml aux cloches de Durham ont été préparés contenant un bouillon YP additionné de 2% de chaque sucre. Ensuite, les tubes ont étéensemencés avec 1 ml de chaque suspension levurienne sélectionné pour cette étude (**Banoth Srinivas et al., 2017**). Une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée comme témoin pour la comparaison de profil de fermentation des sucres avec les différents isolats. Après l'incubation à 35°C pendant 24-48 h, la fermentation du sucre est mise en évidence avec la présence du gaz dans la cloche de Durham. Notons que, tous les essais sont répétés deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

I-12. Activité hémolytique :

Le pouvoir hémolytique des *Saccharomyces* spp. a été mis en évidence par la méthode de **Rochelle et al. (2021)** afin d'évaluer la virulence des isolats. La surface de la gélose YPD additionnée du sang humain à 7% (v/v) estensemencée en surface avec 0.1 ml de chaque suspension levurienne précédemment préparée. Les boites sont mises en incubation à 35°C pendant 24 h et les résultats ont été exprimés par le type d'hémolyse : absence de réaction hémolytique autour des colonies (γ hémolytique), présence d'un anneau clair autour des colonies (β hémolytique) ; présence d'un anneau vert autour des colonies (α hémolytique).

I-13. Activité protéolytique :

Pour déterminer l'activité protéolytique des isolats *Saccharomyces* spp., la surface du milieu Skim milk agar estensemencée avec 100 μ l (approximativement 10^5 UFC/ml) de chaque suspension de levure précédemment préparée. Les boites sont ensuite incubées à 35 °C pendant 24 heures. Les colonies entourées d'halos clairs sont considérées comme des isolats possédant une activité protéolytique (**Moradi et al., 2018**).

I-14. Résistance aux antibiotiques :

Pour étudier l'antibiorésistance des *Saccharomyces* spp., quatre antibiotiques ont été choisi pour cette étude : Ampicilline (Amp, 10 μ g), Erythromycine (E, 15 μ g), Tetracycline (TE, 30 μ g), Gentamicine (Gent, 10 μ g), utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par **Diguta, et al. (2023)**. Les cultures levuriennes ont été préparées dans un bouillon YPD à

35 °C pendant 24 h. Ensuite, 100 µl de chaque isolat ont été ensemencés sur milieu YPD agar. A l'aide d'une pince stérile, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur le milieu YPD agar. Après incubation des boîtes à 35 °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 minimiser l'erreur expérimentale. Les résultats ont été notés comme suit : sensible « S » si le diamètre est >15 mm ou résistant « R » si le diamètre est ≤15mm (**Diguta, et al., 2023**).

I-15. Activité antibactérienne :

Le pouvoir antibactérien des levures a été testé vis-à-vis trois souches bactériennes de référence suivantes : *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *E. coli* ATCC25922 et *Listeria innocua* ATCC33090 proviennent de la collection ATCC (American Type Culture Collection, USA). Pour avoir des cultures jeunes, les souches bactériennes lyophilisées ont été cultivées dans le bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) pendant 48 heures à 35 °C.

Dans cette étude, l'activité antibactérienne a été déterminée par deux méthodes de diffusion en puits sur gélose, la première est décrite par **Magnusson et al. (2001)**, réalisée par des extraits levuriens (ou surnageants), tandis que la deuxième est testée en utilisant des suspensions levuriennes sélectionnées selon **Fernandez-Pacheco et al. (2018)**.

Brièvement, les isolats de levures sélectionnés pour cette étude sont ensemencés dans des tubes contenant un bouillon YPD et incubés à 35 °C pendant 24 h. Ensuite, les surnageants ont été obtenus par centrifugation de cultures de levures à 12000 rpm pendant 5 min à l'aide de centrifugeuse (Eppendorf 5415 D, 22331Humberg), puis les surnageants ont été récupérés à l'aide d'une pipette automatique et transférés dans des Eppendorfs de 1.5 ml. Enfin, les extraits levuriens ont été immédiatement conservés au froid dans une glacière jusqu'à l'analyse.

Des puits (diamètre de 5 mm) ont été creusés à l'aide des embous bleus dans la gélose nutritive contenant 10⁶ UFC/ml des souches bactériennes cibles. Dans la moitié des boîtes, 100 µl de surnageants ont été déposés dans les puits creusés (**Magnusson et al., 2001**), alors que l'autre moitié est inoculée par 100 µl de suspensions levuriennes (approximativement 10⁵ UFC/ml) (**Fernandez-Pacheco et al., 2018**). Après incubation des boîtes à 35 °C pendant 24 h, les zones d'inhibition ont été notées et exprimées comme suit :

- ++, forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits,
- +, faible inhibition autour des puits,
- –, pas de zone d'inhibition.



Figure 14. Centrifugeuse (Eppendorf 5415 D, 22331Humberg) (photographie originale 2023)



Figure 15. Préparation des surnageants (photographie originale 2023)

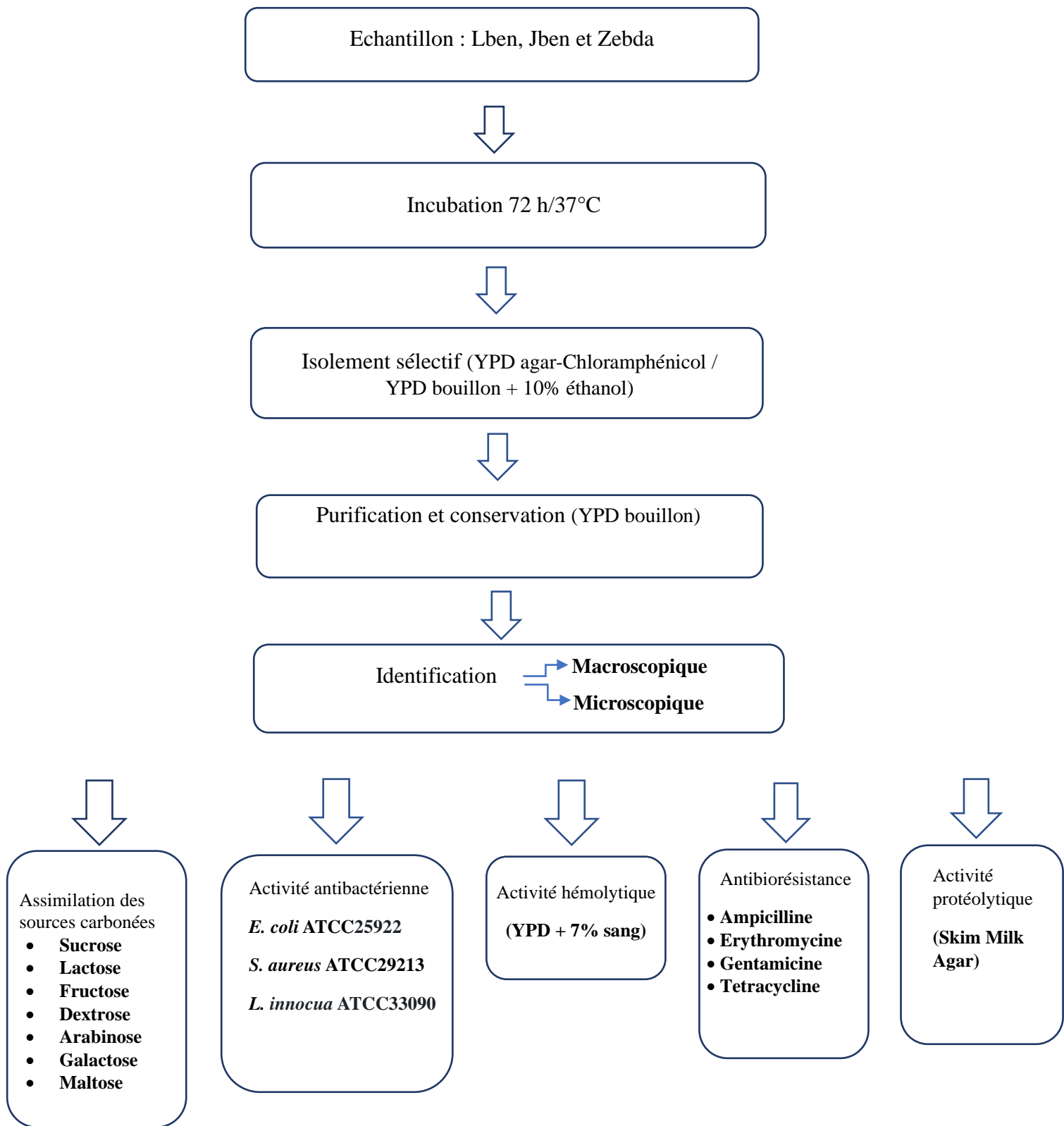


Figure 16 : Logigramme représentant les étapes expérimentales de la présente étude

II-Résultats et discussion :

II-1. Résultats d'isolement :

Après l'incubation à 37°C pendant 72 h, le résultat obtenu montre que la fermentation a eu lieu en remarquant le dégagement de CO₂ lors de l'ouverture des flacons et une augmentation dans le volume. Le résultat est présenté dans la Figure 13 :



Figure 17. Résultat de la préparation des levains traditionnels à partir des trois échantillons traditionnels de Jben Lben et Zebda.

II-2. Identification phénotypique :

II-2-1. Macroscopique :

Les isolats purifiés présentent des caractéristiques communes en ce qui concerne la surface, le relief, le contour, la consistance ainsi que l'opacité des colonies. On a observé des colonies blanches, opaque, circulaires lisses bombées avec un aspect crémeux (Figure 14). Ce qui est reconnue pour les *Saccharomyces* spp. où elles sont des colonies de couleur blanche et un aspect crémeux (Elkhihal et al., 2015) luisantes, lisses et bombées (Saoud et al., 2017).

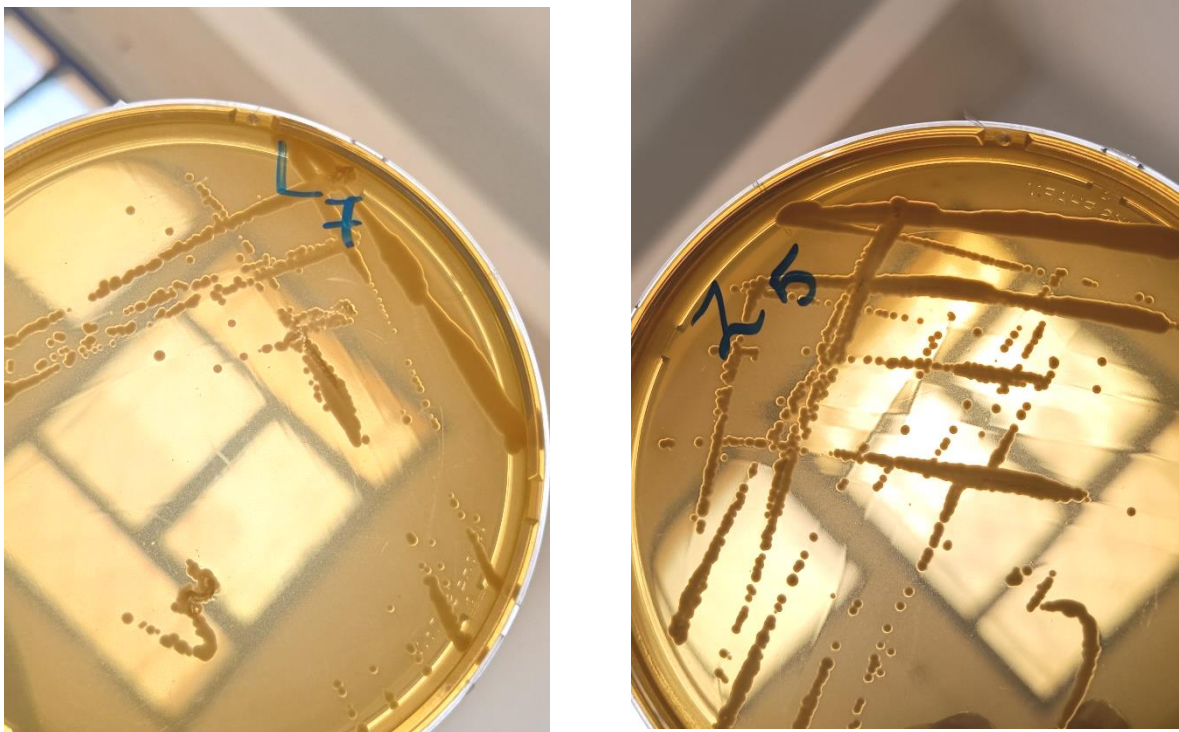


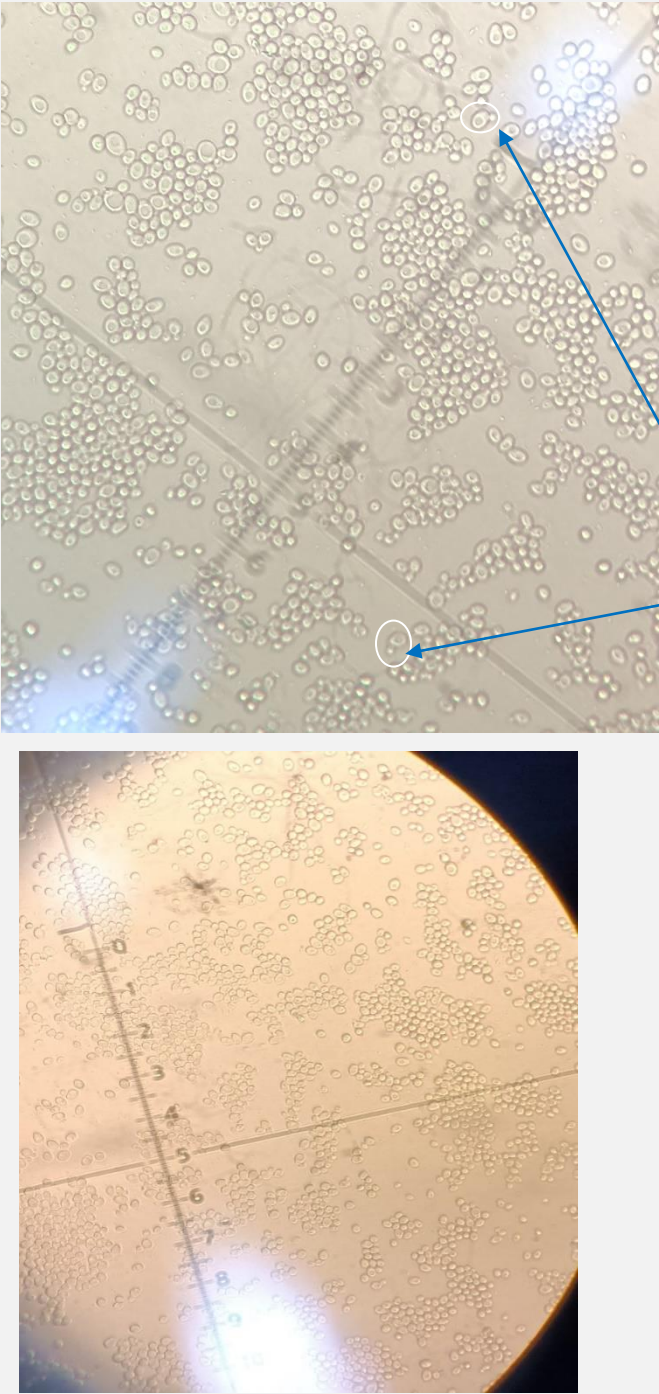
Figure 18. Aspect macroscopique des colonies caractéristiques des isolats Lc7 et Zc5 (photographie originale, 2023)

II-2-2. Microscopique :

L'observation microscopique des levures isolées a été effectuée à l'état frais. Elle a permis de définir leurs formes et leurs arrangements, leurs modes de division, ainsi que leurs tailles cellulaires (Tableau). *Saccharomyces* spp. au grossissement 400X se présente sous forme de cellules isolées, ovoïdes ou arrondies longues et elle possède une paroi cellulaire qui protège la cellule. Ce sont des cellules de bourgeonnement unipolaire avec une dimension de 3,5 à 5 microns (Jabarit, 1970).

Après l'identification macroscopique et microscopique, on a réussi à identifier des isolats caractéristiques isolés à partir de l'échantillon du Lben et celui du Zebda. Sept isolats de levure ont été trouvés dans les échantillons analysés et considérés en tant que *Saccharomyces* spp. Elles ont été codées de la manière suivante pour pouvoir les différencier : Lc1, Lc7, Lc8, Zc4, Zc5, Zc6 et Zc7.

Figure 19. Caractérisation microscopique à l'état frais de l'isolat *Saccharomyces* spp. Lc8 sous l'objectif 40.

Isolat	Observation microscopique sous l'objectif 40	Description microscopique sous l'objectif 40
<p><i>Saccharomyces</i> spp. Lc8</p>		<ul style="list-style-type: none"> -Cellules isolées -Arrondies -Immobilés -Noyau -Membrane plasmique -Bourgeoisement unipolaire <p style="text-align: right;">Bourgeoisement</p>

II-3. Assimilation des sources carboniques :

Le test de l'assimilation des sources carbonés nous a permis de déterminer la capacité des levures à utiliser un sucre/glucide spécifique comme unique source de carbone. Ce test a montré que tous les isolats sont capables de fermenter le fructose et incapable d'assimiler l'arabinose (Tableau). Cette fermentation est observée par la présence de gaz dans les cloches de Durham après incubation des isolats levuriens. Notant aussi que nos isolats ont fermenté le sucrose et le lactose sauf pour les isolats *Saccharomyces* spp. Lc7 et Lc1, respectivement. Le galactose et le maltose ont été fermentés par 5 isolats de levures tandis que le dextrose est assimilé uniquement par 4 isolats de *Saccharomyces* spp. (Tableau 8). Il est important de noter que dans ce test la souche de référence est capable de fermenter tous les sucres, à l'exception de l'arabinose. Il est reconnu que les *Saccharomyces* ne fermentent pas le lactose selon la galerie Api 20 C AUX (BioMérieux, 2007), car elle manque à la fois de lactose perméase et de β -galactosidase qui sont responsables du transport du disaccharide dans le cytoplasme pour l'hydrolyser en monosaccharides (Zou et al ; 2013). Dans notre cas, tous les isolats ont fermenté le lactose sauf Lc1 ce qui nous oblige à se mettre en question, nous avons 3 possibilités : soit nos isolats ont fait une mutation où ils ont réussi à développer le gène LAC4 et LAC12 qui se trouvent chez *Kluyveromyces marxianus*. Les levures *Kluyveromyces* et *Saccharomyces* sont les descendantes d'un ancêtre commun, partageant de fortes similitudes dans leur dotation génétique globale Rubio-Teixeira, M (2006). Dans certaines études, ils introduisent de LAC4 codant pour la β -galactosidase et LAC12 codant pour le transporteur de lactose de *K. marxianus* et *K. lactis* en *S. cerevisiae* ce qui va permettre la fermentation directe du lactose par *S. cerevisiae* modifié (Liu et al ; 2016). Ils préparent ces hybrides pour produire de grande quantité l'éthanol parce que les rendements en éthanol du *K. marxianus* et *K. lactis* sont faibles, ils ne peuvent pas fermenter de fortes concentrations de lactose dans des conditions anaérobies, en revanche, *S. cerevisiae* a longtemps été utilisé pour produire de l'éthanol. Les souches sauvages de *S. cerevisiae* ne peuvent pas assimiler le lactose en raison de l'absence de voies endogènes de son assimilation. La deuxième possibilité est que le lactose utilisé dans cette étude n'était pas de bonne qualité. Enfin, il peut être aussi à cause d'une erreur expérimentale, mentionnant qu'on a répété l'essai plusieurs fois.

Tableau 8 : Résultats de l'assimilation des sources carbonés des isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats	Sucrose	Galactose	Lactose	Fructose	Maltose	Dextrose	Arabinose
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc8	+	+	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyce</i> spp. Lc7	-	+	+	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc1	+	+	-	+	+	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc4	+	+	+	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc5	+	-	+	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc6	+	-	+	+	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc7	+	+	+	+	-	+	-
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	-

Présence de gaz (+) ; Absence de gaz (-)

II-4. Activité Protéolytique :

La gélose au lait écrémé ou Skim milk agar est un milieu efficace pour la détection des protéinases extracellulaires liées aux cellules. L'étude de l'activité protéolytique est faite afin de prouver la présence des enzymes protéolytiques responsables de la protéolyse chez les *Saccharomyces* isolées, qui est déterminées par l'observation d'un halo clair entourant les colonies. Les zones claires dans la gélose au lait écrémé sont produites par des colonies de différentes tailles (**Pailin et al., 2001**). Plus la zone claire est grande plus elle peut être interprétée comme ayant plus de protéolyse. Tous nos isolats ont présenté une activité protéolytique ce qui indique la présence des enzymes « protéase » (Tableau 9). Il est reconnu que les levures du genre *Saccharomyces* présentent une activité protéolytique importante, comme il est indiqué dans l'étude de **Moradi, et al. (2018)** et de **Cordonnier (1967)**. *Saccharomyces cerevisiae* est particulièrement riche en activités protéasiques variées : des

activités protéinasiqes, endo-peptidasiques et exo-peptidasiques ont été descellées et parmi celles-ci des activités carboxypeptidasiques, aminopeptidasiques et aminocarboxypeptidasique. *Saccharomyces* également possède l'équipement enzymatique suffisant pour dégrader les protéines jusqu'au stade ultime des acides aminés. L'activité protéolytiques des levures est utilisée généralement pour l'affinage des fromages (**Kresze, 1991 ; Boiron, 1996**). Les enzymes protéolytiques jouent également un rôle dans la prolifération des flores microbiennes et fongiques des fromages dont on connaît la fonction de « la maturation » des fromages (modification de la texture et de l'arôme) en tant que matériel de protéolyse (**Cordonnier, 1967**).



Figure 20. Résultat du test d'activité protéolytique des isolats Zc5 et Zc7 (photographie originale, 2023).

De plus, les résultats de l'activité hémolytique sont présentés dans le Tableau 9. Tous les isolats de levures testés ont une activité hémolytique γ (non hémolytique) et aucune des isolats examinés n'a montré d'activité β -hémolytique lorsqu'elle a été cultivée dans une gélose YPD au sang humain. L'absence d'activité hémolytique est considérée comme une sécurité préalable à la sélection d'une souche probiotique (**Castro-Rodriguez et al., 2015**). Il est mentionné aussi dans l'étude de **Digutá et al, (2023)** que chez les *Saccharomyces* aucune activité hémolytique n'a été détectée, ce qui confirme le caractère non pathogène des isolats, qui peuvent donc être considérées comme sûres pour une utilisation probiotique dans, par exemple, l'alimentation des poissons.

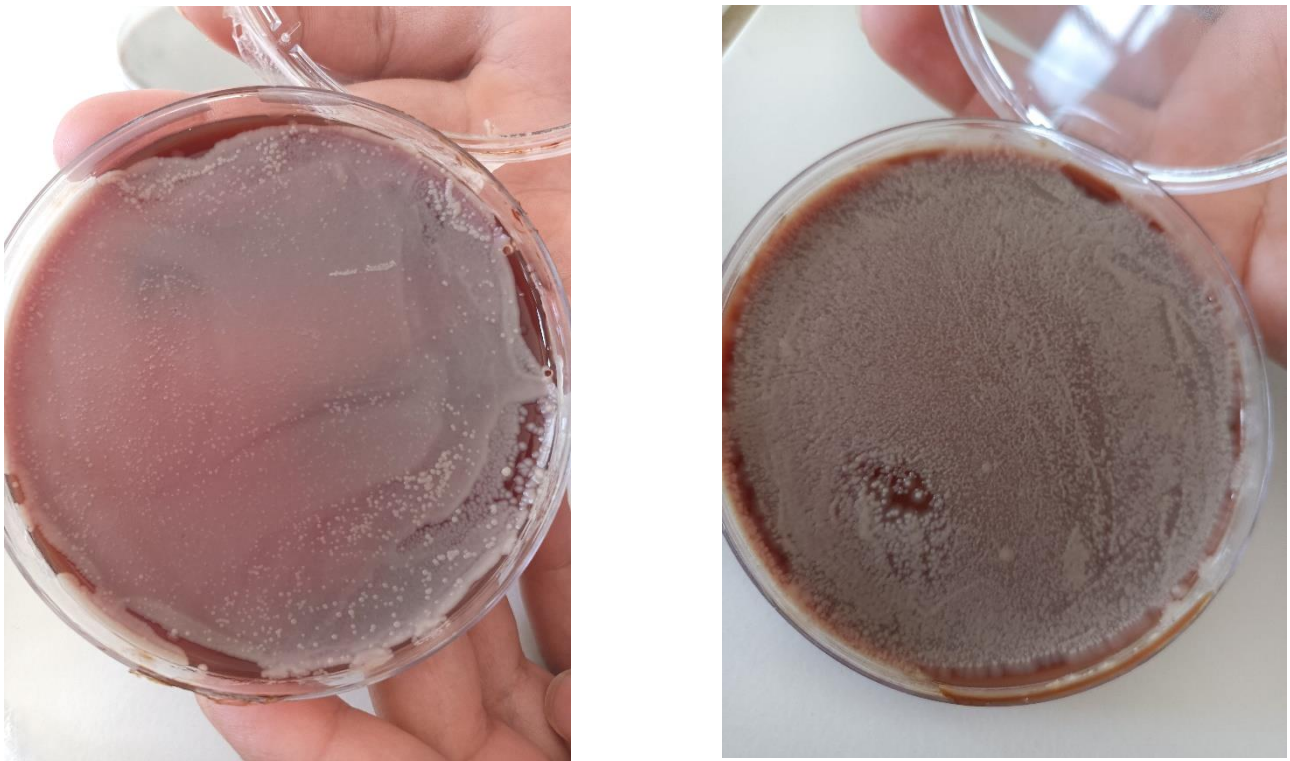


Figure 21. Résultat de test d'activité hémolytique des isolats Zc5 et Lc7 (photographie originale, 2023)

Tableau 9 : Résultats de l'activité protéolytique et hémolytique des isolats de *Saccharomyces* spp

<i>Isolats</i>	Activité protéolytique	Activité hémolytique
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc8	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc7	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc1	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc4	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc5	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc6	+	⌘
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc7	+	⌘
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	⌘

Présence du halo claire (+) ; Absence du halo claire (-)

II-5. Résistance aux antibiotiques :

Après l'incubation des boîtes, le diamètre des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurées. Dans cette étude, la sensibilité aux antibiotiques a été déterminée avec les quatre antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Quatre antibiotiques ont été utilisés : Ampicilline (Amp, 10 µg), Erythromycine (E, 15 µg), Tétracycline (TE, 30 µg), Gentamicine (Gent, 10 µg). La consommation fréquente de ces types d'antibiotiques peut entraîner un déséquilibre dans la microflore intestinale sensible. La résistance aux antibiotiques des probiotiques ne constitue généralement pas un problème de sécurité lors des mutations ou des mécanismes de résistance intrinsèque sont responsables du phénotype de résistance et ainsi l'équilibre microbien peut être préservé. Les souches isolées de *Saccharomyces* spp étaient résistantes aux antibiotiques utilisés et pourraient être utiles pour restaurer la microflore intestinale chez les patients qui sont sous ces traitements d'antibiotiques (Castro-Rodríguez et al., 2015). Les souches probiotiques doivent avoir un profil d'innocuité pour les applications alimentaires et humaines (S. Divyashree et al., 2021). Les observations obtenues indiquent que nos sept isolats sont résistants aux antibiotiques.

Tableau 10. Résultats de la résistance des isolats de *Saccharomyces* spp aux antibiotiques (Amp, Gent, E et TE)

Isolats	TE	Gent	E	Amp
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc8	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc7	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc1	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc4	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc5	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc6	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc7	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	R	R	R	R

Amp (ampicilline, 10ug) ; Gent (gentamicine, 10ug) ; TE (Tétracycline, 30ug) ; E (Erythromycine, 15ug).

Zone d'inhibition > 15mm (S) ; Zone d'inhibition ≤ 15mm (R).

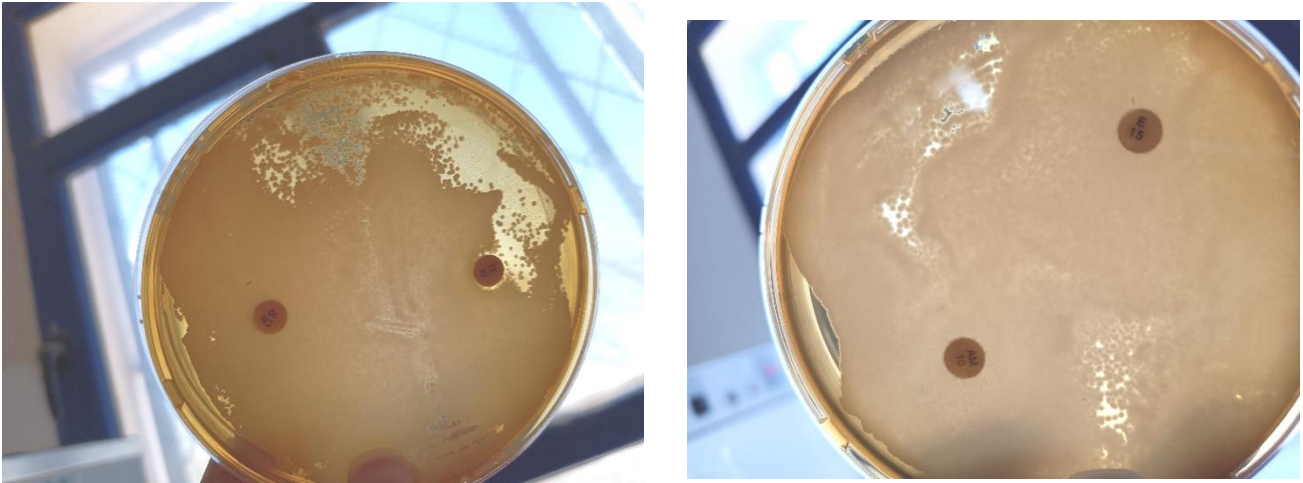
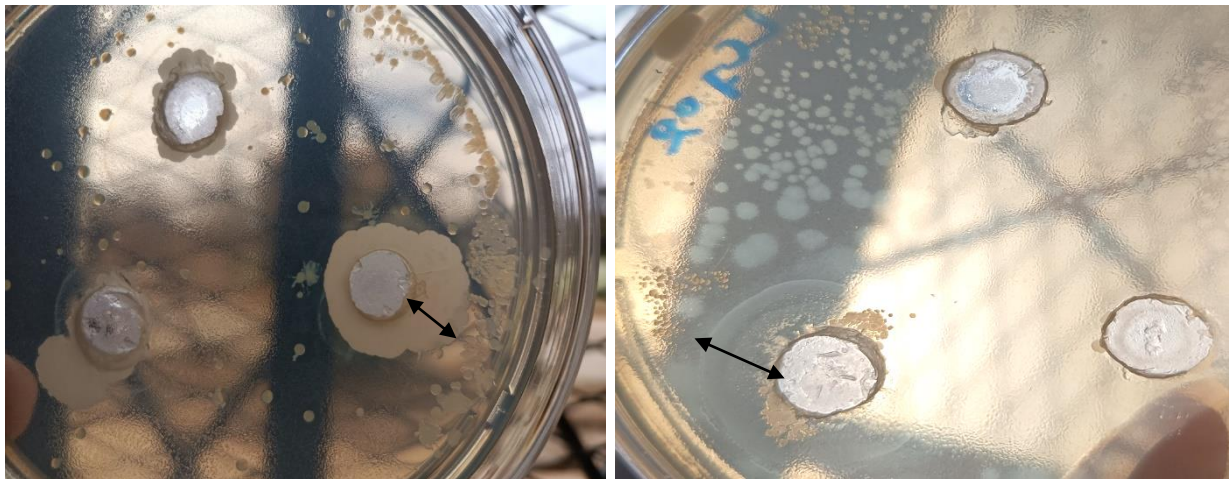


Figure 22. Résultat du test de résistance des levures du genre *Saccharomyces* aux antibiotiques (photographie originale, 2023)

II-6. Activité antibactérienne :

Afin d'évaluer l'effet inhibiteur de nos isolats vis à vis aux bactéries responsables des intoxications alimentaires, des souches bactériennes de référence ont été sélectionnées pour la détermination de l'activité antibactérienne (*Staphylococcus aureus* ATCC29213, *E. coli* ATCC25922 et *Listeria innocua* ATCC33090). Comme indiqué dans le tableau 11, tous les sept isolats avaient une meilleure activité antibactérienne contre tous les gram-positifs testés (*S. aureus* et *L. innocua*) par rapport aux certains autres antibiotiques, suggérant que *Saccharomyces* spp est promettant de remplacer les antibiotiques pour le traitement clinique (Jiang et al., 2021). De plus, ils n'ont pas montré une activité antibactérienne vis à vis *Escherichia coli*, bacilles gram négatif. Un effet remarquable contre les bactéries gram-positives et aucun effet mesurable contre les gram-négatifs.

Les surnageants montrent que les composants responsables de l'activité antibactérienne ne sont pas extracellulaires. L'une des propriétés les plus recherchées des levures probiotiques est l'activité antibactérienne contre les agents pathogènes humains. Les isolats ont montré une activité antimicrobienne modérée contre les bactéries par rapport à l'antibiotique standard (Doxycycline pour les bactéries). Les isolats ont montré une meilleure activité antibactérienne contre les bactéries gram positif que les grams négatifs. Le surnageant de culture a montré la moindre activité antimicrobienne indiquant que les composés antimicrobiens ne sont pas extracellulaires, mais plutôt liés aux cellules.



A

B

Figure 23. Résultat du test de l'activité antibactérienne des isolats de levures du genre *Saccharomyces* (**A** : Culture levurienne ; **B** : Surnageant levurien) (photographie originale, 2023)

De plus, les levures probiotiques qui ont montré une activité antagoniste contre les agents pathogènes humains (**Fakruddin et al., 2017**) tels que *Listeria*, *Escherichia coli* et *Staphylocoque*. Selon **Roostita et al. (2011)**, les composés antimicrobiens des levures étaient connus comme des acides organiques et des protéines qui pouvaient inhiber la croissance des bactéries et des moisissures. Ils ont trouvé que *Saccharomyces cerevisiae* produit plusieurs protéines qui ont la capacité antimicrobienne. Ainsi, les levures ont également la capacité de produire du dioxyde de soufre qui pourrait inhiber la croissance des bactéries lactique d'altération (**Fleet, 2003**).

Tableau 11. Résultats de l'activité antibactérienne des isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats	Surnageant			Culture levurienne		
	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc8	++	++	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc7	++	++	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Lc1	++	++	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc4	++	+	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc5	++	+	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc6	++	++	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> spp. Zc7	++	++	-	++	++	-
<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	++	++	-	++	++	-

(++) forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits ; (+) faible inhibition autour des puits ;

(-) pas de zone d'inhibition.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives :

L'objectif principal de la présente étude est d'une part d'isoler et identifier partiellement des levures appartenant au genre *Saccharomyces* spp. à partir des produits laitiers fermentés traditionnellement et d'autre part d'étudier leurs profils probiotiques. L'isolement sélectif nous a permis d'identifier partiellement 7 isolats de levures qui ont présenté des caractéristiques morphologiques identiques à celle de *Saccharomyces* spp. Le test de l'assimilation des sources carbonés nous a montré que tous les isolats sont capables de fermenter le fructose et incapable d'assimiler l'arabinose.

De plus, tous les isolats de levures testés ne présentent aucune activité hémolytique (γ hémolyse) et possèdent ainsi une activité protéolytique remarquable, ce qui indique la présence des enzymes protéolytiques « protéase ». De plus, toutes les *Saccharomyces* spp. isolées ont résisté aux antibiotiques testés et montré une meilleure activité antibactérienne contre tous les gram-positifs testés (*S. aureus* et *L. innocua*). Néanmoins, aucune activité antibactérienne n'a été observée vis à vis *Escherichia coli*, bacilles gram négatif.

Les aliments naturellement fermentés ont récemment attiré l'attention des professionnels de la santé car ils aident à renforcer la flore intestinale humaine. Les levures isolées dans ce travail appartiennent au genre *Saccharomyces* se sont révélées être de puissants microorganismes probiotiques, ce qui met la lumière sur d'autres idées pour poursuivre cette étude :

- Une confirmation génotypique des souches de *Saccharomyces* spp. testées,
- Etudier l'utilisation thérapeutique et ses avantages potentiels pour les isolats *in vivo* ou dans des modèles animaux,
- Etudier leurs effets bénéfiques pour traiter l'intolérance au lactose et l'utilisé comme traitement.
- Comprendre le mécanisme d'action des probiotiques pour développer de nouvelles stratégies pour traiter ou prévenir les maladies gastro-intestinales et auto-immunes.

Références bibliographiques :

- Abedon, B. G. (1997). The timing of vegetative phase change in maize (*Zea mays* L.): Genetics and relationship with agronomic traits. The University of Wisconsin-Madison.
- Benkerroum, N. et Tamime, A.Y. (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Food Microbiology*, 21, 399–413.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llrente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Benkerroum, N. (2013). Traditional fermented foods of North African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 54-89.
- Belhamra, Z, 2017. Croissance et survie des probiotiques en présence des édulcorants et des additifs alimentaires. Thèse de Doctorat 3eme cycle, Spécialité : Microbiologie. Université Ferhat Abbas Sétif 1. PP 24-25-26-28.
- Bourgeois C.M., et Leveau J.Y. (1980). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Paris : Ed. Lavoisier-Tech et.Doc. 454p
- Czerucka, D., Piche, T., & Rampal, P. (2007). Yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767-778.
- Castro-Rodri'guez, Diana., Herná'ndez-Sa'nchez, Humberto et Ya'n'ez Ferná'ndez, Jorge. (2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. *Probiotics and antimicrobial proteins* 7, 107–117.
- Cordonnier, R. (1967, January). les proteases de *saccharomyces cerevisiae* : leur intérêt technologique. In *Annales de la nutrition et de l'alimentation* (pp. B247-B272). Centre national de la recherche scientifique.
- Cordonnier, C. (2015). Survie et pathogénicité des EHEC dans l'environnement digestif: Interactions avec le microbiote et l'épithélium intestinal.: Influence de l'administration de levures probiotiques (Doctoral dissertation, Université d'Auvergne-Clermont-Ferrand I).

- Czerucka, D., & Rampal, P. (2019). Diversity of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 mechanisms of action against intestinal infections. *World Journal of Gastroenterology*, 25(18), 2188.
- Deshapriya, R. M. C., Rahularaj, R., & Ransinghe, R. M. S. B. K. (2019). Mastitis, somatic cell count and milk quality: an overview. *Sri Lanka Veterinary Journal*, 66(1), 1-12.
- Digut, ă, C.F.; Mihai, C.; Toma, R.C.; Cîmpeanu, C.; Matei, F. *In Vitro* Assessment of Yeasts Strains with Probiotic Attributes for Aquaculture Use. *Foods* 2023, 12, 124.
- Dunn, C. G. (1958). The industrial utilization of Yeasts. *Economic Botany*, 12(2), 145-163.
- Delaherche, A., Reynou-Gravier, G., Rivel, S., Marullo, P., & Masneuf-Pomarede, I. (2010). *Saccharomyces uvarum*, vers un développement industriel pour la vinification des vins blancs et rosés. agris.fao.org.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S129-S134.
- Divyashree, S., Anjali, P. G., Somashekaraiah, R., & Sreenivasa, M. Y. (2021). Probiotic properties of *Lactobacillus casei*-MYSRD 108 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against *Salmonella paratyphi*. *Biotechnology Reports*, 32, e00672.
- Elkhihal, B., Elhalimi, M., Ghfir, B., Mostachi, A., Lyagoubi, M., & Aoufi, S. (2015). Infection urinaire à *Saccharomyces cerevisiae* : levure émergente ? *Journal de Mycologie Medicale*, 25(4), 303-305.
- FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine (No. 28). Food & Agriculture Org..
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Fernandez-Pacheco, P., Arévalo-Villena, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Pérez, A. B. (2018). Probiotic characteristics in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Properties for application in food industries. *LWT*, 97, 332-340.
- Fakruddin, M. D., Hossain, M. N., & Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 1-11.

- Fiedurek, J., Skowronek, M., & Gromada, A. (2011). Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. *Pol J Microbiol*, 60(1), 51-58.
- Graf, C., & Sarasin, F. P. (2007). Probiotiques: efficacité. *Rev Med Suisse*, 3, 2350-4.
- Gibson, B., & Liti, G. (2015). *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32(1), 17-27.
- G.G. Stewart, *Saccharomyces* | Introduction, Editor(s): Carl A. Batt, Mary Lou Tortorello, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2014.
- Gaisawat, M. B., Iskandar, M. M., MacPherson, C. W., Tompkins, T. A., & Kubow, S. (2019). Probiotic supplementation is associated with increased antioxidant capacity and copper chelation in *C. difficile*-infected fecal water. *Nutrients*, 11(9), 2007.
- Hencke, S. (2000). Utilisation alimentaire des levures (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- Idoui, Tayeb., Benhamada, Nabila et Leghouchi, Essaid. (2010). Microbial quality, physicochemical characteristics and fatty acid composition of a traditional butter produced from cows' milk in East Algeria. *Grasas y aceites* 61 (3), 232-236.
- Jabarit, A. (1970). Influence d'un certain nombre de facteurs de croissance et de différents traitements thermiques du lactosérum sur la fermentation alcoolique du lactose par *Saccharomyces lactis*. *Le Lait*, 50(499-500), 658-666.
- Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). *Microbiologie Technique Tome 1" Dictionnaire des techniques"*. Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine, 967-971.
- Jiang, R., Zhang, P., Wu, X., Wang, Y., Rehman, T., Yao, X., ... & Yang, Z. (2021). Expression of antimicrobial peptide Cecropin P1 in *Saccharomyces cerevisiae* and its antibacterial and antiviral activity in vitro. *Electronic Journal of Biotechnology*, 50, 16-22.
- Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2012). Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 5(2), 111-125.
- Kreger -Van Rij N-J, 1984. *The yeast, a Taxonomic Study*, Elsevier Biomedical Suarit, R., Gopal, P-K, et Sherped, M-G, 1988. Evidence for a glycosidic linkage between

chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol, 134,: 359 - 368.)

- Kresze G. B. (1991). Proteases during purification. Bioprocess-technol. 12 : 85-120.
- Leksir, C., Boudalia, S., Moujahed, N., & Chemmam, M. (2019). Traditional dairy products in Algeria: case of Klila cheese. Journal of Ethnic Foods, 6(1), 1-14.
- Liu, J. J., Zhang, G. C., Oh, E. J., Pathanibul, P., Turner, T. L., & Jin, Y. S. (2016). Lactose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* capable of fermenting cellobiose. Journal of Biotechnology, 234, 99-104.
- Magnusson, J., & Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology, 67(1), 1-5.
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. Microorganisms, 8(8), 1142.
- Mkadem, W., Belguith, K., Semmar, N., Zid, M. B., ElHatmi, H., & Boudhrioua, N. (2022). Effect of process parameters on quality attributes of Lben: Correlation between physicochemical and sensory properties. LWT, 155, 112987.
- Moradi, Reyhaneh., Nosrati, Rahim., Zare, Hamed., Tahmasebi, Tahereh., Sadari, Horieh et Owlia, Parviz. (2018). Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* strains. IJM Iranian Journal of Microbiology 10(2), 123-131.
- Moonga HB, Schoustra SE, Linnemann AR, Kuntashula E, Shindano J, Smid EJ (2019) The art of mabisi production : A traditional fermented milk. PLoS ONE 14(3), e0213541.
- McFarland, L. V. (2010). Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. World Journal of Gastroenterology: WJG, 16(18), 2202-4
- McFarland, L. V. (2015). From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. Clinical Infectious Diseases, 60(suppl_2), S85-S90.
- Nikulin, J., Vidgren, V., Krogerus, K., Magalhães, F., Valkeemäki, S., Kangas-Heiska, T., & Gibson, B. (2020). Brewing potential of the wild yeast species *Saccharomyces paradoxus*. European Food Research and Technology, 246, 2283-2297.
- Obodai, M. et Dodd, Christine E.R. (2006). Characterization of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, nyarmie, by culture- and nonculture-based methods. Applied Microbiology International 100, 1355-1363.

- Ouadghiri, M. (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine..... ?
- Pang, Y., Zhang, H., Wen, H., Wan, H., Wu, H., Chen, Y., ... & Liu, X. (2022). Yeast Probiotic and Yeast Products in Enhancing Livestock Feeds Utilization and Performance : An Overview. *Journal of Fungi*, 8(11), 1191.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS microbiology*, 6(1), 1.
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., & Teixeira, M. C. (2020). *Saccharomyces boulardii*: what makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*, 6(2), 78.
- Piquepaille, C. (2013). Place des probiotiques dans le traitement de diverses pathologies intestinales. Pharmacie. Limoge.
- Qamar, A., Aboudola, S., Warny, M., Michetti, P., Pothoulakis, C., LaMont, J. T., & Kelly, C. P. (2001). *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin A immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infection and Immunity*, 69(4), 2762-2765.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 664-698.
- Rochelle, Prunella Pereira., Reshma, Jadhav., Abhishek, Baghela et Delicia Avilla Barretto. (2021). In vitro Assessment of Probiotic Potential of *Saccharomyces Cerevisiae* DABRP5 Isolated from Bollo Batter, a Traditional Goan Fermented Food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 13,796–808.
- Rose, A. H. (1960). Yeasts. *Scientific American*, 202(2), 136–149. <http://www.jstor.org/stable/24941264>
- Roostita,L.B., Fleet, G.H.,Wendry, S.P., Apon,Z.M et Gemilang, L.U.(2011).Determination of Yeasts Antimicrobial Activity in Milk and Meat Products. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(6), 442-445.
- Rubio-Teixeira, M. (2006). Endless versatility in the biotechnological applications of *Kluyveromyces* LAC genes. *Biotechnology Advances*, 24(2), 212-225.
- Saoud, M. Z., Rhatous, M., El Mire, S., Lyagoubi, M., & Aoufi, S. (2017). *Saccharomyces cerevisiae*, une levure de plus en plus impliquée dans les infections urinaires : À propos de 3 cas. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(3), e31-e32.

- Suvarna, V. C., & Bobby, V. U. (2005). Probiotics in human health: A current assessment. *Current Science*, 88(11), 1744-1748.
- Sulieman, A. M. E., Rahman, E. H. A., & Mustafa, W. A. (2020). Capabilities of algae to be utilized as a renewable energy source. *Academic Journal of Life Sciences*, 6(3), 18-26.
- Srinivas, B., Rani, G. S., Kumar, B. K., Chandrasekhar, B., Krishna, K. V., Devi, T. A., & Bhima, B. (2017). Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. *AMB express*, 7(1), 1-14.
- T. Pailin, D.H. Kang., Schmidt, K et Fung, D.Y.C. (2001). Detection of extracellular bound proteinase in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology* 33, 45-49.
- Tantaoui-Elaraki, A., Berrada, M., El Marrakchi, A., & Berramou, A. (1983). Etude sur le Lben marocain. *Le lait*, 63(627-628), 230-245.
- Tantaoui-Elaraki, A., & El Marrakchi, A. (1987). Study of Moroccan dairy products: Iben and smen. *MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 3, 211-220.
- Terciolo, C., Dapoigny, M., & Andre, F. (2019). Beneficial effects of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on clinical disorders associated with intestinal barrier disruption. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 67-82.
- Ulacio D., Perez C., Pineda Y.J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro*. 9 (1) : 3-11.
- Ui-Haq, S., & Raju, G. G. (2002, October). Influence of moisture adsorption in high temperature dielectrics. In *Annual Report Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena* (pp. 861-864). IEEE.
- Vilain, A. C. (2010). Qu'est-ce que le lait?. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 124-127.
- Walker, G. M. (2009). Yeasts. In *Desk encyclopedia of microbiology* (pp. 1174-1187). Academic Press/Elsevier.
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.

- Zou, Jing., Guo, Xuewu., Shen, Tong., Dong, Jian., Zhang, Cuiying et Xiao, Dongguang. (2013). Construction of lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* for lactose fermentation into ethanol fuel. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40, 353–363.