



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 : Abdelaziz Nossiba

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 farines céréalières : Antibiorésistance, activité hémolytique et antibactérienne.

Jury de soutenance :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme. Lounici Safia	MAA	Présidente
Mr. Mokhtar Rahmani Mohamed	MAA	Examineur
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: عبد العزيز نسيبة

ميدان: علوم الطبيعية و الحياة

شعبة: علوم غذائية

تخصص: صناعات غذائية و مراقبة النوعية

موضوع البحث

العزل والتعرف الجزئي على خمائر من جنس *Saccharomyces* من دقيق

الخبوب: مقاومة المضادات الحيوية ، انحلال الدم

و النشاط المضاد للبكتيريا.

أعضاء لجنة المناقشة :

الاسم و اللقب	الدرجة العلمية :	الصفة
السيدة لونيسي صفية	استاذة مساعدة ا	رئيسا
السيد مختار رحمانى محمد	أستاذ مساعد ا	ممتحن
السيد هويشر عبد الرحمن	استاذ تعليم عالي	مقررا

الدفعة: جوان -2023

Nom et Prénom : Abdelaziz Nossiba.

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

Résumé :

L'objectif de la présente étude est d'isoler et identifier des levures du genre *Saccharomyces* à partir de levain fermenté traditionnellement (farines céréalières). L'isolement a permis d'identifier dix (10) isolats de levures présentant des caractéristiques morphologiques identiques à celle *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude de la fermentation des sucres a montré que les isolats de levures sont capables d'assimiler le fructose, le sucrose et le galactose, et incapable de fermenter l'arabinose et le lactose. Le test de l'activité hémolytique des levures a montré que tous les isolats sont γ hémolytique (absence d'hémolyse). De plus, l'activité protéolytique est enregistrée pour tous les isolats de *Saccharomyce* spp., tandis que, le test d'antibiorésistance a montré que tous les isolats de *Saccharomyces* sont résistants aux différents antibiotiques testés (Erythromycine, Ampicilline, Gentamicine et Tetracycline). Les résultats de l'activité antibactérienne a permis de déterminer que les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*, Gram positif, sont sensibles à l'activité de tous les isolats de *Saccharomyces* spp., par contre, une absence totale de l'activité antibactérienne des isolats de levures vis à vis la souche bactérienne *Escherichia coli*, Gram négatif. Le présent travail est une étude préliminaire pour la recherche des levures de genre *Saccharomyces* afin de sélectionner des isolats probiotiques pour pouvoir être utilisés en industrie des aliments fermentés et/ou en biotechnologie.

Mots clés : Blé, levain, *Saccharomyces*, probiotique, hémolyse, protéolyse, antibiorésistance, activité antibactérienne.

الاسم و اللقب : نسيبة عبد العزيز.

الموضوع : العزل والتعرف الجزئي على خمائر من جنس *Saccharomyces* من دقيق الحبوب: مقاومة المضادات الحيوية ، انحلال الدم و النشاط المضاد للبكتيريا .

الملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتحديد الخمائر من جنس *Saccharomyces* من العجين المخمر تقليديا (دقيق الحبوب).سمح العزل بتحديد عشر (10) عزلات من الخميرة ذات الخصائص المورفولوجية المماثلة لخصائص *Saccharomyces cerevisiae*. أظهرت دراسة تخمير السكر أن عزلات الخميرة قادرة على تخمير الفركتوز والسكروز والجالاكتوز ، وغير قادرة على تخمير الأرابينوز واللاكتوز. أظهر اختبار نشاط انحلال الدم للخميرة أن جميع العزلات كانت γ hémolytique (عدم وجود انحلال الدم). بالإضافة إلى ذلك، يتم تسجيل نشاط التحلل للبروتين لجميع عزلات *Saccharomyce spp*. بينما، أظهر اختبار مقاومة المضادات الحيوية أن جميع عزلات *Saccharomyces* مقاومة للمضادات الحيوية المختلفة المختبرة (Gentamicine, Ampicilline, Erythromycine) و (Tetracycline). اتاحت نتائج النشاط المضاد للبكتيريا تحديد أن السلالات البكتيرية *Staphylococcus aureus* و *Listeria innocua*، موجبة الجرام حساسة تجاه نشاط جميع عزلات *Saccharomyces spp*. من ناحية أخرى ، الغياب التام للنشاط المضاد للبكتيريا لعزلات الخميرة ضد السلالة البكتيرية *Escherichia coli* ، سالبة الغرام. العمل الحالي عبارة عن دراسة أولية لبحوث الخمائر من جنس *Saccharomyces* من أجل اختيار عزلات بروبيوتيك لتكون قادرة على استخدامها في صناعة الأغذية المخمرة و / أو في التكنولوجيا الحيوية.

الكلمات المفتاحية : القمح ، العجين المخمر ، *Saccharomyces* ، بروبيوتيك ، انحلال الدم، تحلل البروتين، مقاومة المضادات الحيوية، النشاط المضاد للبكتيريا.

Full name: Abdelaziz Nossiba.

Theme: Isolation and partial identification of yeasts of the genus *Saccharomyces* from cereal flours: Antibiotic resistance, hemolytic and antibacterial activity.

Abstract:

The main objective of this study is to isolate and identify yeasts of the genus *Saccharomyces* from traditionally fermented sourdough (cereal flours). Ten (10) yeasts were isolated and identified as *Saccharomyces* spp. presenting the morphological characteristics identical to that of *Saccharomyces cerevisiae*. The study of the fermentation of sugars showed that the yeast isolates are able to assimilate fructose, sucrose and galactose, and unable to ferment arabinose and lactose. The hemolytic activity assay showed that all isolates are γ hemolytic (absence of hemolysis). In addition, proteolytic activity is recorded for all isolates of *Saccharomyces* spp., while, the antibiotic resistance test showed that all *Saccharomyces* isolates are resistant to the different antibiotics tested (Erythromycin, Ampicillin, Gentamicin and Tetracycline). The results of the antibacterial activity made it possible to determine that the bacterial strains *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua*, Gram positive, are susceptible to the activity of all isolates of *Saccharomyces* spp., on the other hand, a total absence of antibacterial activity of yeast isolates against the bacterial strain *Escherichia coli*, Gram negative. The present work is a preliminary study for the research of yeasts of the genus *Saccharomyces* in order to select probiotic isolates to be able to be used in the fermented food industry and/or in biotechnology.

Keywords: Wheat, sourdough, *Saccharomyces*, probiotic, hemolysis, proteolysis, antibiotic resistance, antibacterial activity.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents pour leur aide, leur amour si chaleureux et leurs encouragements indéfectibles. Qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours académique.

A mes chers frères :

Saad, Taha El-Amine, Ali Hyder

A ma très chère sœur :

Messaouda

A toute ma famille sans exception.

A toutes mes amies.

Remerciements

Avant tout, je remercie « ALLAH » tout puissant qui m'a donné la foi et la force pour accomplir ce modeste travail.

*J'exprime ma profonde gratitude à mon promoteur : Monsieur **Pr. Houchier Abderrahmane**, de m'avoir encadrée avec sa cordialité franche et coutumière, je le remercie pour sa patience, pour ses conseils et ses orientations clairvoyantes qui m'ont guidée dans la réalisation de ce travail.*

*Mes sincères considérations aux membres du jury, Madame, **Dr. Lounici Safia** et Monsieur, **Dr. Mokhtar Rahmani Mohamed** qui ont bien voulu accepter d'évaluer ce travail en sacrifiant un peu de leur temps si précieux.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur, **Dr. Arrarem Ahmed** pour son aide et ses conseils précieux.*

Liste des tableaux

Tableau N° (01) : Les différentes compositions des céréales.	05
Tableau N° (02) : Des informations concernant les farines céréalières.	19
Tableau N° (03) : La préparation de levain naturelle fermenté traditionnellement à partir des farines céréalières.	19
Tableau N° (04) : Caractéristique morphologique des isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	28
Tableau N° (05) : Résultats de fermentation des sucres par les isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	29
Tableau N° (06) : Résultats de l'activité hémolytique et protéolytique d'isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	32
Tableau N° (07) : Résultats de test de résistance aux antibiotiques d'isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	33
Tableau N° (08) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolats de <i>Saccharomyces</i> spp.	36

Liste des figures

Figure N° (01) : La structure générale d'un grain de blé	04
Figure N° (02) : Principales caractéristiques d'une cellule typique de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .	14
Figure N° (03) : Les différentes variétés de farines céréalières (blé dur, blé tendre, Orge).	18
Figure N° (04) : Les différents disques d'antibiotique utilisés dans cette étude	22
Figure N° (05) : La centrifugeuse (eppendorf 5415 D, 22331Humberg).	23
Figure N° (06) : Souche bactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.	24
Figure N° (07) : Souche bactérienne <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	24
Figure N° (08) : Logigramme du Protocole expérimental de la présente étude.	25
Figure N° (09) : Résultats de la fermentation de levain.	26
Figure N° (10) : Résultat de γ hémolyse.	30
Figure N° (11) : Résultats de l'activité protéolytique de l'isolats DC2, DC6.	31
Figure N° (12) : Résultats de test de résistance aux antibiotiques d'isolats de levures.	33
Figure N° (13) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat TC11 vis à vis <i>Staphylococcus aureus</i> .	35
Figure N° (14) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat DC2 vis à vis <i>Listeria innocua</i> .	35
Figure N° (15) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat témoin vis-à-vis <i>Escherichia coli</i> .	35

Liste des abréviations

BHIB : Brain Heart Infusion Bouillon.

FAO: Food and Agriculture Organization.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

YPD : Yeast Peptone Dextrose.

Table des matières

Tables des matières

Dédicace

Remerciements

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction **01**

Partie I : Etude bibliographique

Chapitre I : Généralité sur les céréales et levain.

1. Généralité sur les céréales **03**

1.1 Structure des grains de céréales **03**

1.2 Composition des céréales **04**

2. Levain **05**

2.1 Historique **05**

2.2 Levain **05**

2.3 Propriétés du levain **06**

2.4 Les types de levain **06**

2.5 Microflore du levain **07**

Chapitre II : Levures et leur domaine d'application.

1. Les levures **08**

1.1 Généralités et historique **08**

1.2 Classification des levures **08**

1.3 Habitat **09**

1.4 Morphologie **09**

1.5 Structure **09**

1.6 Reproduction végétative **11**

1.7 Les Besoins nutritives	11
1.7.1 Sources de carbone	12
1.7.2 Source d'azote	12
1.8 Conditions physiques	12
1.8.1 Temperature	12
1.8.2 L'eau	13
1.8.3 pH	13
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
3. Domaine d'application de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
3.1 Dans l'industrie du pain	14
3.2 Dans la fabrication des Boissons alcoolisées	15
3.3 Dans la fabrication de fromage	15
3.4 Utilisation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comme probiotique	16

Partie II : Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Echantillonnage	18
2. Préparation de levain	19
3. Isolement des levures	19
4. Purification et conservation des levures	20
5. Caractéristique morphologique	20
5.1 Observation macroscopique	20
5.2 Observation microscopique	20
6. Fermentation des sucres	21
7. L'activité hémolytique	21
8. L'activité protéolytique	21

9. L'antibiorésistance	21
10. L'activité antibactérienne	22
Résultats et discussion	
1. Levain	26
2. Isolement des levures	26
3. Caractéristique morphologique	26
3.1 Observation macroscopique	26
3.2 Observation microscopique	27
4. Fermentation des sucres	29
5. L'activité hémolytique	30
6. L'activité protéolytique	32
7. L'antibiorésistance	31
8. L'activité antibactérienne	33
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	38
Annexes	42

Introduction

Introduction

Les céréales sont les aliments de base les plus importants pour l'humanité dans le monde et représentent le principal constituant de l'alimentation animale. Les principales céréales sont le blé, le maïs, le riz, l'orge, le sorgho, le millet, l'avoine et le seigle (**Koehler et Wieser, 2013**). Le levain est un mélange de farine de blé et/ou de seigle et d'eau, fermenté par des bactéries lactiques et des levures spontanées provenant de la farine et de l'environnement, qui déterminent son pouvoir acidifiant et levant (**Cosetti, 2013**).

De plus, les différents facteurs endogènes comme les constituants des céréales (glucides, protéines, lipides et minéraux...etc.) et les activités enzymatiques ainsi que les paramètres technologiques de préparation du levain tels que la température, l'oxygène et le temps de fermentation influencent fortement la microflore du levain et les caractéristiques des produits de boulangerie (**Corsetti et Settanni, 2006**). La microflore du levain est composée généralement d'une association stable de lactobacilles et de levures, notamment du fait d'interactions métaboliques. De telle association microbienne peut perdurer pendant des années, bien que le procédé de fermentation se déroule dans des conditions non aseptiques. (**De Vuyst et Neysems, 2005**).

Les aliments fermentés sont des sources de micro-organismes tels que les levures, qui ont divers effets bénéfiques sur la santé humaine, présentant un potentiel en tant que probiotiques. Les probiotiques ont montré leur efficacité comme des compléments alimentaires car ils procurent des avantages à la santé des consommateurs. Cependant, ils doivent être soigneusement sélectionnés par des tests *in vitro* et *in vivo* avant d'être ajoutés à un produit alimentaire. Dans le cas des levures, seules deux espèces ont été reconnues actuellement comme probiotiques : *Saccharomyces cerevisiae* et *S. boulardii* (**Lara Hidalgo et al., 2017**).

Les levures sont des micro-organismes unicellulaires qui sont connues de l'homme depuis des milliers d'années car elles ont été utilisées dans des processus de fermentation tels que la production de boissons alcoolisées et la levée du pain (**Umeh et al., 2017**), spécialement la *Saccharomyces cerevisiae* qui est fréquemment présente dans les levains (**Gobbetti, 1998**). En plus de son utilisation en industrie agroalimentaire pour son rôle dans la fabrication de plusieurs aliments, elle est aussi utilisée comme complément nutritionnel ou encore comme agent bio-thérapeutique (**De Llanos et al., 2010**).

Dans ce cadre, l'objectif de notre étude est d'isoler et d'identifier partiellement des levures appartenant au genre *Saccharomyces* à partir de levain fermenté traditionnellement afin d'étudier leur capacité à fermenter les différents sucres principalement le sucrose, le galactose, le lactose, le fructose, le maltose, le dextrose, l'arabinose. De plus, cette étude s'intéresse à l'évaluation de leur aspect sécuritaire en testant l'antibiorésistance, l'activité antibactérienne et hémolytique ainsi que leur pouvoir protéolytique.

Dans ce travail, la première partie présente une synthèse bibliographique qui se divise en deux chapitres. Le premier chapitre rapporte des généralités sur les céréales et le levain, tandis que le deuxième chapitre traite la *Saccharomyce cerevisiae* et leurs domaines d'application. La seconde partie est consacrée au matériel et méthodes utilisés pour la réalisation pratique de cette étude ainsi que les différents résultats obtenus et leur discussion. Enfin, nous terminerons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

Partie I :
Etude bibliographique

Chapitre I

1. Généralité sur les céréales

Les céréales sont les graines ou grains comestibles de la famille des graminées qui ont été utilisées depuis longtemps par les humains. Toutes les céréales partagent certaines similitudes structurelles et consistent en un embryon (ou germe), qui contient le matériel génétique d'une nouvelle plante, et endosperme, qui est rempli de grains d'amidon. Ce sont des aliments de base et ils sont des sources importantes de nutriments dans les pays développés comme dans les pays en développement. Les céréales et les produits céréaliers sont une importante source d'énergie, de glucides, de protéines et de fibres, et contiennent une gamme de micronutriments tels que la vitamine E, certains des Vitamines B, magnésium et zinc (McKevith, 2004).

Parmi Les principales céréales sont le blé, le maïs, le riz, l'orge, le sorgho, le millet, l'avoine et le seigle. Ils sont cultivés sur près de 60% des terres cultivées dans le monde (Koehler et Wieser, 2013). Le blé est l'aliment de base du régime alimentaire d'une grande partie de la population mondiale. Il représente près de 20 à 80 % de la consommation alimentaire totale dans diverses régions du monde. En plus d'être riche en un certain nombre de composés phytochimiques, le blé possède des propriétés uniques de formation de gluten, ce qui le rend adapté à la production d'un grand nombre de produits de boulangerie. L'avoine, le psyllium et l'orge occupent une place importante dans l'alimentation humaine dans diverses régions, et ils sont également riches en composés phytochimiques (Sidhu et al., 2007).

1.1 Structure des grains de céréales

Le grain de blé (*Triticum aestivum* L.) se compose de 3 parties anatomiques principales : un embryon (germe), un endosperme et un péricarpe (son). Le germe, l'endosperme et le son constituent respectivement 3, 82 et 12 % du grain de blé entier. Le grain de blé mesure environ 8 mm de long et pèse environ 35 mg, mais la taille du grain varie selon le cultivar et son emplacement sur l'épi ou l'épi. Le grain de blé a un pli longitudinal qui s'étend sur toute la longueur du grain sur la face ventrale. Ce pli rend non seulement difficile pour le meunier de séparer le son de l'endosperme, mais abrite également des micro-organismes et de la poussière. Le tégument contient un brin de pigment qui détermine la couleur du grain de blé. Il est généralement blanc ou rouge et est déterminé par la génétique. Le grain de blé a une couche d'aleurone épaisse d'une cellule, qui entoure complètement l'endosperme amylacé et le germe. Lors de la mouture, le son et le germe sont séparés de l'endosperme. La majeure partie de la fraction d'endosperme se retrouve dans la farine blanche (71 %), et la partie de

l'endosperme (comme la couche d'aleurone) qui ne peut pas être séparée du son et du germe se retrouve sous forme de short (Sidhu et al., 2007).

Les grains d'orge (*Hordeum Vulgare* L.) sont différents du blé, car ils sont récoltés avec la coque intacte. Le grain d'orge moyen pèse environ 35 mg. Sous la coque, l'orge est composée de péricarpe (son), de germe et d'endosperme (Sidhu et al, 2007). L'épi d'orge est composé d'épillets, qui sont attachés au rachis en alternance. De plus, Les couches externes du grain d'orge consistent en une enveloppe recouvrant complètement le grain, le péricarpe (auquel l'enveloppe est étroitement liée chez la plupart des espèces), le testa ou tégument et l'aleurone. L'orge est principalement cultivée pour l'alimentation animale, en particulier pour les porcs, pour le maltage et le brassage dans la fabrication de bière et pour la distillation dans la fabrication de whisky. (McKevith, 2004).

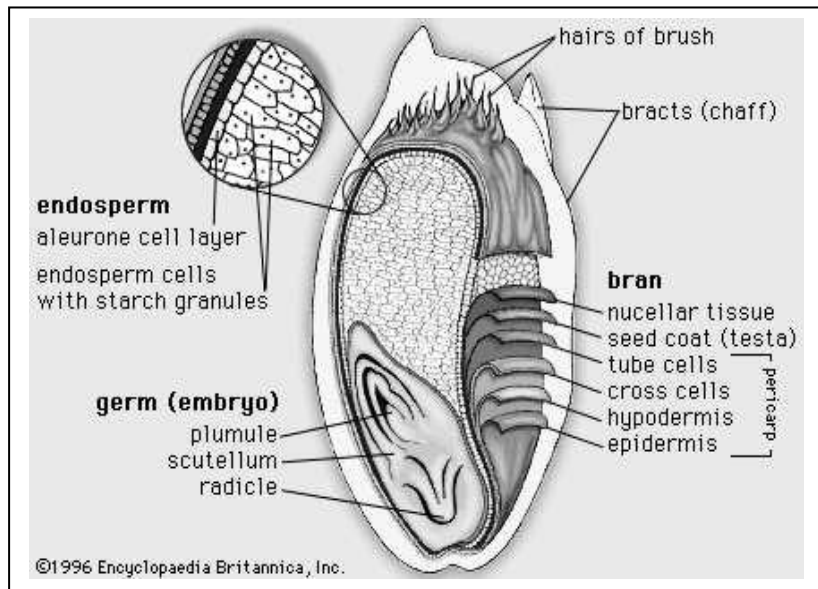


Figure N° (01) : La structure générale d'un grain de blé (Šramková et al., 2009).

1.2 Composition des céréales

La composition chimique des grains de céréales (humidité 11–14%) se caractérise par la teneur élevée en glucides, principalement l'amidon déposé dans l'endosperme et les fibres, principalement situées dans le son. Le deuxième groupe est constitué par les protéines qui se situent dans une fourchette moyenne. Les lipides des céréales font partie des constituants mineurs (2 à 4 %) avec les minéraux (1 à 3 %). La teneur relativement élevée en vitamines B est, en particulier, d'importance nutritionnelle (Koehler et Wieser, 2013). En général, les céréales sont composées de 65-75 % de glucides, 7-12 % de protéines, 2-6 % de lipides, 12-

14 % d'eau. De plus, chaque céréale a sa propre composition unique basée sur les types de céréales, le sol, emplacement, localisation géographique (**Baniwal et al., 2020**).

Tableau N° (1) : Les différentes compositions des céréales (Baniwal et al., 2020).

Céréales	Énergie (kcal)	Protéine (g)	Glucides (g)	Fibre (g)	Lipides (g)
Blé	399	13.3	71	10.7	2
Blé dur	198	7	40	7	>1%
Orge	352	9.9	77.7	15.6	2.3g
Sorgho	329	10.62	70.09	6.7	3.3g
Mais	360	8.9	72.2	2	3.9g

2. Levain

2.1 Historique

Les céréales sèches ne peuvent être consommées qu'après broyage et mélange avec de l'eau. Un tel mélange, entraînant la formation d'une pâte caractérisée par un arôme aigre lorsqu'il est laissé seul pendant un certain temps, peut avoir été le premier exemple d'aliment fermenté utilisé par l'humanité. Les premières preuves de cuisson de la pâte levée sont datées d'environ 1500 avant JC par des peintures murales égyptiennes, bien que le pain au levain fasse déjà partie de l'alimentation européenne il y a 5000 ans. Le levain était utilisé comme agent levant dans la production de pain jusqu'à ce qu'il soit remplacé par la levure de boulanger au 19^{ème} siècle ; dès lors son usage se réduisit au pain artisanal et au pain de seigle (**Corsetti et Settanni., 2006**).

2.2 Levain

D'après **Cosetti (2013)**, le levain est un mélange de farine de blé et/ou de seigle et d'eau, éventuellement additionné de sel, fermenté par des bactéries lactiques et des levures spontanées provenant de la farine et de l'environnement, qui déterminent son pouvoir acidifiant et levant (**Cosetti, 2013**).

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

Vogel et al. (1999) ont montré que le levain s'agit à la base, d'un mélange de farine de blé ou de seigle, du sel et de l'eau potable soumis à une fermentation lente (24 à 48 h) initiée par des levures et des bactéries lactiques contenues dans la farine (**Vogel et al., 1999**). Ainsi, bien que la production de levain varie légèrement d'un pays à l'autre, elle repose sur le même principe (mélange d'ingrédients fermentés à un moment précis) et sur les mêmes ingrédients principaux (farine, eau).

2.3 Propriétés du levain

La fermentation du levain affecte la rhéologie de la pâte à 2 niveaux, dans le levain lui-même et dans le levain contenant de la pâte à pain. De nombreuses propriétés inhérentes au levain reposent sur les activités métaboliques de son LAB (Lactic Acid Bacteria) résident : la fermentation lactique, la protéolyse et la synthèse de composés volatils, la production d'anti-moisissure comptent parmi les activités les plus importantes pendant la fermentation du levain. De plus, les facteurs endogènes aux produits céréaliers (glucides, sources d'azote, minéraux, lipides et acides gras libres, et enzyme activités) et les paramètres du processus (température, rendement en pâte, l'oxygène, le temps de fermentation et le nombre de propagation du levain étapes) influencent nettement la microflore du levain et les caractéristiques des produits de boulangerie au levain (**Chavan et chavan, 2011**).

2.4 Les types de levain

Selon **Yazar et Tavman (2012)**, les levains, sur la base de la technologie appliquée, ont été regroupés en 3 types : type I, type II et type III.

Les levains de type I qui sont produits avec des techniques traditionnelles et se caractérisent par une propagation continue (quotidienne) pour maintenir les micro-organismes dans un état actif, comme l'indique une activité métabolique élevée, surtout en ce qui concerne la levée, c'est-à-dire la production de gaz. Généralement, les procédés de fermentation en trois étapes sont utilisés à une température inférieure à 30 °C (**Yazar et Tavman, 2012**).

Le type II est un type industriel de levain utilisant des souches adaptées pour démarrer la fermentation. Ces types de levains, souvent utilisés comme suppléments de levain lors de la préparation du pain, sont des préparations en silo semi-fluides caractérisées par de longues périodes de fermentation (de 2 à 5 jours) et des températures de fermentation plus

élevées (30° C) pour accélérer le processus. L'industrialisation du processus de cuisson du pain de seigle et la demande industrielle de processus de fermentation plus rapides, plus efficaces, contrôlables et à grande échelle ont entraîné le développement de levains de type II. De plus, la levée est soutenue par l'ajout de levure boulangère, Les levains de type II sont facilement pompables dans une boulangerie industrielle en raison de leur semi-caractéristique liquide (Yazar et Tavman, 2012).

Les levains de type III sont des pâtes séchées contenant des LAB résistant au processus de séchage, qui sont utilisés comme acidifiant supplémentaires et porteurs d'arômes. Procédés de type III sont initiés par des ferments lactiques définis. En plus des pâtes de type II, les pâtes de type III nécessitent l'ajout de levure de boulanger pour la levée. Les levains de type III sont le moyen le plus pratique d'introduire le goût authentique du pain dans l'industrie de la boulangerie high-tech actuelle (Yazar et Tavman, 2012).

2.5 Microflore du levain

La microflore des céréales crues est composée de bactéries, levures et champignons (10^4 - 10^7 UFC/g), tandis que la farine contient 2×10^4 et 6×10^6 UFC/g (De Vuyst et Neysems, 2005). Les lactobacilles, obligatoirement homofermentaires et facultativement ou obligatoirement hétérofermentaires, sont les LAB typiques du levain. *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lb. Plantarum* et *Lb. Brevis* sont les lactobacilles les plus fréquemment isolés. *Saccharomyces cerevisiae* est fréquemment présente ou ajoutée. La quantité de *S. cerevisiae* peut être surestimée en raison du manque de systèmes fiables pour identifier et classer les levures de cet habitat. En particulier *S. exigus* (état imparfait *Torulopsis holmii* ou *Candida holmii*, physiologiquement similaire à *C. milleri*), et *C. krusei*, *Pichianorvegensis* et *Hansenula anomala* sont des levures associées aux LAB dans les levains. Le ratio LAB : levure dans les levains est généralement de 100:1. Comme d'autres aliments fermentés produits par microflore mixte, les propriétés organoleptiques, sanitaires et nutritionnelles des produits de boulangerie au levain dépendent de l'activité coopérative des LAB et des levures (Gobbetti, 1998).

Chapitre II

1. Les levures

1.1 Généralités et historique

Les levures sont des champignons unicellulaires, vivent en général sous forme de cellules isolées. Lorsqu'elles ont acquis une certaine dimension se divisent et produisent ainsi de cellules files qui le plus souvent ne tendent pas à se séparer à s'accroître et se diviser à leur tour de la même manière (**Guilliermond, 1912**). Les cellules reproduisent par bourgeonnement ou fission (**Kreger Van, 1984**). Les levures offrent des formes qui varient seulement de la sphère à l'ellipse, elles sont enveloppées d'une membrane assez épaisse, renfermant des vacuoles et des granules réfringents. Ils sont en effets très polymorphes et capables d'affecter des formes et des dimensions sensiblement différents (**Guilliermond, 1912**).

Les levures sont connues de l'homme depuis les milliers d'années (**Umeh et al., 2017**). La première personne à voir une cellule de la levure à traverses ses microscopes c'est le hollandais Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723). Ensuite, Erxleben a exprimé l'opinion que la levure était un organisme vivant responsable de la fermentation (1835). Pasteur à traverse de ces études sur les boissons alcoolisés, a montré que la présence de ces organismes été essentielle au processus de fermentation (1822-1895). Hansen il est reconnues comme étant à l'origine de l'étude des caractéristiques morphologiques et établi le premier système complet de taxonomies des levures en 1896 (**Spencer et Spencer, 1997**). Une troisième étape dans l'étude de levure fut marquée par la découverte due à Buchner, de la zymase alcoolique, qui fait faire un pas considérable à l'étude physiologique notamment la connaissance de la nutrition et du mécanisme de la fermentation alcoolique (**Guilliermond, 1912**).

1.2 Classification des levures

L'identification et la classification des levures reposaient sur la morphologie de la cellule, la capacité de culture à forme des spores, la morphologie des spores et la capacité d'utiliser et fermenter une demi-douzaine des sucres et utiliser le nitrate comme source d'azote et ont à ajoutons des composés carbonés (**Spencer et Spencer, 1997**).

Selon **Kreger Van. (1984)**, les levures sont taxonomiquement diverses et comprennent des ascomycètes et basidiomycètes et un troisième groupe, les levures imparfaites, ont à la fois des affinités ascomycètes et basidiomycètes (deutéromycètes) (**Kreger Van, 1984**).

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

1.3 Habitat

Les levures ne sont pas aussi omniprésentes que les bactéries dans l'environnement naturel, mais elles peuvent néanmoins être isolées du sol, de l'eau, des plantes, des animaux et des insectes. Les habitats préférés des levures sont les tissus végétaux (feuilles, fleurs et fruits), mais quelques espèces se trouvent dans des relations commensales ou parasitaires avec les animaux (**Walker, 2009**).

1.4 Morphologie

Les levures sont des champignons unicellulaires qui ont des caractéristiques d'ultrastructure similaires à celles des cellules eucaryotes supérieures. Ceci, combiné à leur facilité de croissance et à leur aptitude aux analyses biochimiques, génétiques et moléculaires, fait des levures des organismes modèles dans les études de biologie cellulaire eucaryote (**Walker, 2009**). Les Levures offrent des formes qui varient seulement de la sphère à l'ellipse (**Guilliermond, 1912**). De plus, la taille des cellules de levure peut varier considérablement, selon les espèces et les conditions de croissance. Certaines levures peuvent ne mesurer que 2 à 3 µm de long, tandis que d'autres peuvent atteindre des longueurs de 20 à 50 µm. La largeur des cellules apparaît moins variable, entre 1 et 10 µm (**Walker, 2009**).

1.5 Structure

Le noyau : le noyau est relativement assez gros par rapport à la cellule (1µ environ de diamètre), il occupe une position variable, suivant la forme de la cellule et son stade de développement quelle que soit sa situation. Le noyau souvent en relation avec la vacuole qui renferme les corpuscules métachromatiques et situé dans son voisinage, mais ce fait, qui n'est d'ailleurs pas absolument constant, s'explique facilement, étant donné que le noyau joue un rôle important dans la nutrition et dans les sécrétions et que la vacuole est le siège d'une sécrétion intense. Le noyau présente toujours une structure différenciée, il est entouré d'une

membrane colorée et constitué par un nucléoplasme incolore dans lequel on trouve un nucléole et une charpente chromatine qui est très distincte dans la *Saccharomyces cerevisiae*, la chromatine y'étant particulièrement abondante. Par sa structure, ce noyau ne se distingue donc pas des noyaux typiques des autres organismes, et notamment de ceux qu'on observe dans la plupart des champignons. Le noyau est toujours uni que dans chaque cellule s'allongent, restent superposées et forment des filaments qui constituent des rudiments de mycélium. Nous parlerons plus loin de division nucléaire (**Guilliermond, 1912 ; Walker, 1998**)

Le cytoplasme : cytoplasme subtil, au cours de l'évolution des cellules, de grandes variations au cours du développement, très dense et généralement homogène dans les cellules jeunes. Il renferme dans la majorité des levures, notamment les levures sphériques ou ovales (*Saccharomyces cerevisiae*), et généralement au centre une vacuole remplie de corpuscules métachromatiques. Le cytoplasme est donc le siège de nombreuses sécrétions : corpuscules métachromatiques glycogène, grains basophiles et graisses (**Guilliermond, 1912, Walker, 1998**)

- Les corpuscules métachromatiques : ce sont les éléments les plus abondants qui se trouvent dans les levures. Ils paraissent donc jouer un rôle très important dans la vie cellulaire. Ces corps sont presque exclusivement localisés dans certaines vacuoles, soit dans une unique vacuole qui occupe le centre de la cellule, soit dans deux vacuoles polaires. Ils peuvent exister dans le cytoplasme. C'est là qu'ils semblent naître. Une fois élaborés par le cytoplasme, ils se localisent dans les vacuoles aux dépens desquelles ils s'accroissent, pour ensuite se dissoudre au moment de leur utilisation. Ils fixent à l'état vivant certains colorants. Le rôle de la méta-chromatine s'éclaircit définitivement lorsqu'on observe la sporulation des levures. Ils subissent donc la même évolution que les graisses et le glycogène, qui sont très abondants dans les cellules en voie de sporulation, et jouent comme eux le rôle de matière de réserve (**Guilliermond, 1912**).
- Le glycogène : Il est très abondant dans les cellules, il existe dans presque toutes les levures. Le glycogène apparaît dans les cellules dès le début de la fermentation et atteint son maximum au bout de 48 heures, localisé dans des vacuoles distinctes de celles qui renferment les corpuscules métachromatiques. Il diminue ensuite pour disparaître peu à peu à la fin de la fermentation. Pendant la sporulation, il s'accumule en grande quantité dans les asques et est absorbé par les ascospores pendant leur maturation (**Guilliermond, 1912**).

- Les grains basophiles : très rares dans les cellules jeunes, deviennent très nombreux au cours du développement, notamment entre 12 et 24 heures ; Ils ne sont pas visibles sur le vivant et ne prennent pas les colorants vitaux. Ils résistent à la plupart des fixations et présentent à peu près les mêmes caractères de coloration que la chromatine. Ils se colorent surtout par l'hématoxyline ferrique, qui leur donne une teinte noire intense analogue à celle du noyau ; mais cette coloration est moins stable et ils résistent moins facilement aux décolorants. D'autre part, ils restent nombreux au moment de la sporulation et contribuent à la formation des ascospores (**Guilliermond, 1912**).
- Les graisses se présentent sur le vivant sous forme de granules réfringents, de dimension variable, situés dans cytoplasme et qui prennent avec l'acide osmique une coloration brune, ils apparaissent surtout pendant la sporulation, où ils servent d'aliment aux ascospores (**Guilliermond, 1912**).

La membrane : la membrane est épaisse et présente un double contour très net. Elle renfermerait par une hémicellulose facilement hydrolysable par l'action prolongée des acides et des alcalis (**Guilliermond, 1912 ; Walker, 1998**).

1.6 Reproduction végétative

Le bourgeonnement est le mode de reproduction végétative le plus courant dans les levures et est typique des levures ascomycètes telles que *Saccharomyces 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 la paroi cellulaire. Les parois cellulaires des bourgeons mère et fille 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. Chez le *Saccharomyces cerevisiae*, la taille des cellules à la division est asymétrique, les bourgeons étant plus petits que les cellules mères lorsqu'ils se séparent (**Walker, 2009**).

1.7 Les Besoins nutritives

Les cellules de levure ont besoin de macronutriments (sources de carbone, d'azote, d'oxygène, de soufre, de phosphore, de potassium et de magnésium) au niveau milli-molaire

dans les milieux de croissance, et elles ont besoin d'oligo-éléments (par exemple, Ca, Cu, Fe, Mn et Zn) au niveau micro- molaire (**Walker, 2009**).

1.7.1 Sources de carbone

Les levures sont des microchampignons chimio-organotrophes qui obtiennent leur carbone et leur énergie en métabolisant des substrats organiques. Bien que le glucose soit couramment utilisé comme seule source de carbone pour la croissance des levures dans laboratoire, ce sucre n'est généralement pas librement disponible dans les milieux de fermentation industriels. Dans ces milieux, les sources de carbone les plus courantes sont le maltose (comme dans le moût de malt pour le brassage), le saccharose (comme dans la mélasse pour la production de rhum), le lactose (comme dans les boissons à base de lactosérum au fromage) et le fructose (comme dans les polys fructanes d'Agave spp. Pour Tequila). Ce n'est que dans les jus de fruits et le moût de vin que le glucose libre sera disponible, ainsi que le fructose (**Walker et Stewart, 2016**).

1.7.2 Source d'azote

Le sulfate d'ammonium est un nutriment couramment utilisé dans les milieux de croissance des levures car il fournit une source à la fois d'azote et de soufre assimilables. Certaines levures peuvent également se développer sur le nitrate comme source d'azote, et s'il en est capable, peut également utiliser des concentrations sous-toxiques de nitrite. Une variété de composés azotés organiques (acides aminés, peptides, purines, pyrimidines et amines) peut également fournir 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**).

1.8 Conditions physiques

La plupart des espèces de levures se développent dans des environnements chauds, dilués, sucrés, acides et aérobies.

1.8.1 Temperature:

La plupart des levures de laboratoire et industrielles par exemple, les souches de *Saccharomyces cerevisiae* poussent mieux entre 20° et 30 °C. La température maximale la plus basse pour la croissance des levures est d'environ 20° C, tandis que la plus élevée est d'environ 50° C (**Walker, 2009**).

1.8.2 L'eau :

Les levures ont besoin d'eau à haute concentration pour leur croissance et leur métabolisme. Plusieurs levures d'altération des aliments sont capables de résister à des conditions de faible potentiel hydrique (c'est-à-dire des concentrations élevées de sucre ou de sel), et ces levures sont appelées osmotolérantes ou aérotoélérantes (Walker, 2009).

1.8.3 pH :

La plupart des levures poussent très bien entre pH 4,5 et 6,5. Les milieux acidifiés avec des acides organiques sont plus inhibiteurs de la croissance des levures que les milieux acidifiés avec des acides minéraux. En effet, les acides organiques non dissociés peuvent abaisser le pH intracellulaire suite à leur translocation à travers la membrane cellulaire de la levure (Walker, 2009).

2. *Saccharomyces cerevisiae*

La *Saccharomyces cerevisiae*, appartient à la subdivision du règne fungique ascomycotina de la famille de Saccharomycètes, est l'eucaryote le mieux étudié et un outil précieux pour la plupart des aspects de la recherche fondamentale sur les organismes eucaryotes (Parapouli et al., 2020). Elle est présentée naturellement dans plusieurs habitats distincts, notamment les fruits, les fleurs, les insectes et l'écorce des chênes (Tilakaratna et Bensasson, 2017). De plus, elle peut sporuler et survivre dans le sol (Jouhten et al., 2016). La *Saccharomyces cerevisiae* est un champignon unicellulaire, possédant un ADN génomique nucléaire de 12068 kilobases (kb) organisé en 16 chromosomes (Parapouli et al., 2020), et généralement possède une forme ellipsoïde ou ovidés avec un grand diamètre de 5 à 10 µm et un plus petit diamètre d'environ 5 µm. Toutes les levures sont des champignons unicellulaires qui ont des caractéristiques d'ultrastructure similaires à celles des cellules eucaryotes supérieures. C'est-à-dire qu'ils comprennent une paroi cellulaire, un noyau, des mitochondries, un réticulum endoplasmique (ER), un appareil de Golgi, des vacuoles, des micro-organismes et des vésicules sécrétoires ainsi qu'un réseau complexe de membranes extracellulaires et intracellulaires (Figure 2) (Walker et Stewar, 2016). Cela est dû à sa nature unicellulaire, qui simplifie souvent les choses, offrant la combinaison des faits que presque toutes les fonctions biologiques trouvées chez les eucaryotes sont également présentes et bien conservées chez *S. cerevisiae*.

De plus, contrairement à d'autres organismes modèles, *Saccharomyces cerevisiae* est concomitamment d'une grande importance pour diverses applications biotechnologiques, dont certaines remontent à plusieurs milliers d'années. L'utilité biotechnologique de *Saccharomyces cerevisiae* réside dans ses caractéristiques biologiques uniques, c'est-à-dire sa capacité de fermentation, accompagnée de la production d'alcool et de CO₂ et sa résistance aux conditions défavorables d'osmolarité et de faible pH. Parmi les applications les plus importantes impliquant l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* figurent celles dans les industries de production d'aliments, de boissons, en particulier de vin, et de biocarburants (Parapouli et al., 2020).

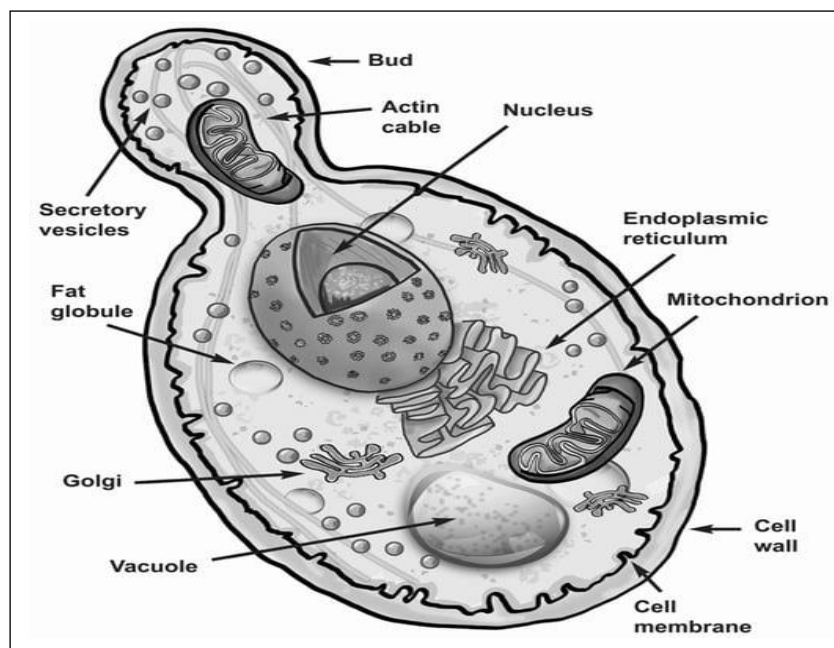


Figure N° (02) : Principales caractéristiques d'une cellule typique de *Saccharomyces cerevisiae* (Walker et Stewart, 2016).

3. Domaine d'application de *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 Dans l'industrie du pain :

La pratique de la panification est l'un des procédés biochimiques les plus anciens au monde. La fabrication du pain nécessite le mélange de farine, d'eau et de levain. Selon la culture et l'emplacement géographique, alors que le levain était un mélange de farine et d'eau, contenant de la levure en fermentation et des bactéries lactiques (LAB). Le *S. cerevisiae* est généralement inoculé dans la pâte à pain à une concentration de 2 % du total des ingrédients.

L'oxygène emprisonné dans la pâte pendant le mélange est consommé en quelques minutes par la respiration des cellules de levure, et dans les conditions anaérobies qui se forment, la reproduction des cellules de levure ralentit vers le bas et la réaction de fermentation a lieu. Les conditions optimales pour la fermentation dans la pâte se situent autour de 34 à 38 C à un pH de 4,0 à 5,2, en utilisant des cellules fraîches car les cellules plus anciennes nécessitent un temps de fermentation plus long. Un facteur possible qui retarde la multiplication des levures est l'ajout de matières grasses, de sel ou d'épices (**Parapouli et al., 2020**).

3.2 Dans la fabrication des Boissons alcoolisées :

Les boissons alcoolisées sont produites suite à la fermentation des sucres par des levures, principalement des souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Les matières premières sucrées peuvent provenir d'amidons de céréales (qui nécessitent une pré-hydrolyse enzymatique) dans le cas des bières et des whiskies, de plantes riches en saccharose (mélasse ou jus de canne à sucre) dans le cas des rhums, ou de fruits (qui ne nécessitent une pré-hydrolyse) dans le cas des vins et des eaux-de-vie. En présence de sucres, ainsi que d'autres nutriments essentiels tels que les acides aminés, les minéraux et les vitamines, *S. cerevisiae* conduira le métabolisme fermentatif à l'éthanol et au dioxyde de carbone (comme métabolites primaires de fermentation) alors que les cellules s'efforcent de produire de l'énergie et de régénérer la coenzyme NAD⁺ dans des conditions anaérobies. Les levures produiront également de nombreux métabolites secondaires qui agissent comme d'importants congénères d'arômes de boissons, notamment des alcools supérieurs, des esters, des carbonyles et des composés soufrés. Celles-ci sont très importantes pour dicter les caractéristiques finales de saveur et d'arôme des boissons telles que la bière et le vin, mais aussi des boissons distillées telles que le whisky, le rhum et le brandy. Par conséquent, les levures sont d'une importance vitale pour fournir la teneur en alcool et les profils sensoriels de ces boissons (**Walker et Stewart, 2016**).

3.3 Dans la fabrication de fromage :

Les levures sont disponibles comme cultures starter pour la production de fromage à pâte molle et elles font partie intégrante de la microflore des fromages affinés par des champignons. Le rôle positif des levures dans la maturation et la formation d'arômes dans le camembert. Les cinq levures suivantes sont prédominantes dans les fromages à moisissure

blanche : *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *K. marxianus* var. *marxianus*, *Debaryomyces hansenii*, *S. cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Un rôle positif des levures a été proposé pour les fromages à moisissure bleue, et les levures à l'intérieur du fromage atteignent des nombres significativement plus élevés que ceux observés pour les fromages à moisissure blanche. Selon les investigations citées, la flore levurine prédominante des fromages, assez similaire pour la moisissure blanche et bleue. Elle est caractéristique de l'écosystème du fromage, la saumure fromagère et les conditions environnementales régnant dans la laiterie qu'elles sélectionnent vers une flore de levure homogène et bien définie. Ainsi, une situation peut exister qui est très similaire à une utilisation délibérée de levures comme ferments lactiques, qui reste l'exception plutôt que la règle (**Jakobsen et al., 2002**).

3.4 Utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* comme probiotique :

Selon la définition de la FAO/OMS, les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent des avantages pour la santé à l'hôte (**Rajkowska et al., 2012**). Les probiotiques ont établi leur efficacité en tant que compléments alimentaires car ils procurent des avantages aux consommateurs ; cependant ils doivent être soigneusement sélectionnés par des tests *in vitro* et *in vivo* avant d'être ajoutés à un produit alimentaire. Cette évaluation comprend l'identification, les tests *in vitro* tels que la tolérance aux acides et sels biliaires, les propriétés d'adhérence de la paroi cellulaire, l'adhésion à la muqueuse intestinale et à l'épithélium cellulaire, l'immunomodulation, la pathogénicité et la résistance aux antibiotiques et enfin les tests *in vivo* (**Lara-Hidalgo et al., 2017**).

Les souches probiotiques doivent être inoffensives, non toxiques pour l'hôte, survivre au transit gastro-intestinal, être fortement concentrées dans le produit et conserver leur viabilité tout au long de la durée de conservation. Les effets bénéfiques pour l'hôte comprennent la réduction du cholestérol, la production de vitamines, d'enzymes et de folates, l'activité antibactérienne et antioxydante, ainsi que l'amélioration du système immunitaire (**Lara-Hidalgo et al., 2017**).

Les souches *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces boulardii* sont actuellement utilisées comme espèces de levures probiotiques (**Lara-Hidalgo et al., 2017**). *Saccharomyces cerevisiae* présentait des caractéristiques probiotiques telles que des interactions antagonistes

contre les agents pathogènes, en plus de survivre à travers le tractus intestinal. Certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* sont également commercialisées comme compléments alimentaires en raison de leur forte teneur en nutriments et en minéraux **(Romero-Luna et al., 2018)**.

Les cultures de levures probiotiques ont été utilisées à la fois comme agent préventif et thérapeutique pour le traitement de diverses maladies diarrhéiques. *Saccharomyces cerevisiae* serait efficace dans le traitement de la diarrhée associée aux antibiotiques, de la diarrhée du voyageur, de la diarrhée chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine et les patients atteints du syndrome du côlon irritable, ainsi que de diarrhée aiguë et chronique chez les enfants et les adultes **(Rajkowska et al., 2012)**. De plus, *Saccharomyces cerevisiae*, est une souche de levure non pathogène qui peut utiliser comme vaccin thérapeutique pour traiter le cancer et les maladies infectieuses **(Ardian et al., 2010)**.

Partie II :
Partie expérimentale

Matériel et méthodes

L'objectif principal de ce travail est d'isoler et identifier partiellement des levures du genre *Saccharomyces* à partir de levain fermenté traditionnellement afin d'étudier leurs aspects probiotiques en évaluant les aspects suivants : l'antibiorésistance, l'activité hémolytique et antibactérienne.

1. Echantillonnage

Trois variétés de céréales ont été utilisées dans cette étude et qui sont le blé dur, le blé tendre et l'orge (Figure N°03). Le prélèvement a été effectué dans trois différentes exploitations agricoles privées. Les échantillons de blé dur et d'orge sont prélevés au niveau des exploitations situées dans la commune de Sebgag, région d'Aflou, wilaya de Laghouat durant le mois de novembre 2022, tandis que l'échantillon de blé tendre est collecté au niveau d'une exploitation située dans la région d'Al-Tal wilaya de Tiaret durant le mois de janvier 2023. Chaque échantillon a été moulu et tamisé manuellement de manière traditionnelle dans la maison. Toutes les informations concernant l'échantillonnage ont été résumées dans le tableau N° (02).



Figure N° (03) : les différentes variétés de farines céréalières (blé dur, blé tendre, Orge).

Tableau N° (02) : des informations concernant les farines céréalières.

Variétés	Date	Origine	Quantité	Stockage
Blé dur	Novembre 2022	Laghouat (Sebgag, Aflou)	300 g	Dans des sacs en plastique
Blé tendre	Janvier 2023	Tiaret (Al-Tal)	400 g	
Orge	Novembre 2022	Laghouat (Sebgag, Aflou)	300g	

2. Préparation de levain

La préparation de levain naturelle consiste à mélanger chaque variété de farine céréalière avec l'eau physiologique stérile chauffé à 45°C puis passer par un enrichissement de la flore naturelle de la farine (**Bourgeois et Larpent., 1996**). Les étapes de préparation de levain sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau N° (03) : La préparation de levain naturelle fermenté traditionnellement à partir des farines céréalières.

Jour	Ingrédients	Incubation (repos)
1 ^{er} jour	50 g de farine + 50 ml d'eau physiologique stérile	35°C/24h
2 ^{ème} jour	50 g de farine + 50 ml d'eau physiologique stérile	35°C/24h
3 ^{ème} jour	50 g de farine + 50 ml d'eau physiologique stérile	35°C/24h

3. Isolement des levures

Après la préparation de levain à partir des différentes farines, deux méthodes d'isolement sélectif des levures ont été utilisées. La première est réalisée sur un milieu solide YPD agar (yeast 1%, peptone 2%, dextrose 2%) additionné de chloramphénicol (0.1 g/l) (**Annexe I**). A partir de 3 échantillons de levain, une solution mère est préparée en mélangeant 10 g de chaque levain avec 90 ml d'eau physiologique stérile et homogénéisés pendant quelques minutes. A partir de cette solution mère (10^{-1}), une série de dilutions décimales sont préparées jusqu'à 10^{-3} (**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 à 35 °C pendant 72 heures.

La deuxième est réalisée sur un milieu liquide YPD bouillon additionné de 10% éthanol (Mounir et al., 2016) A partir des 3 échantillons de levain, 5 g 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 et des séries de dilutions décimales sont préparées jusqu'à 10^{-3} (Ulacio et al., 1997). Après homogénéisation, 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 incubées pendant 3 jours à 35 °C.

4. Purification et conservation des levures

A l'aide des pipettes pasteur stériles, les colonies caractéristiques sont ensemencées en stries sur le milieu de culture YPD agar et les boîtes sont ensuite incubées à 35 °C pendant 72 h. Pour la conservation des isolats, les colonies pures obtenues sont transférées dans des tubes à essais contenant 9 ml YPD bouillon puis incubés pendant 48h à 35 °C. Les isolats sont conservés pour une période d'un mois maximum.

5. Caractéristique morphologique

5.1 Observation macroscopique

L'étude macroscopique consiste à observer à l'œil nu l'aspect, la forme, la couleur, la taille, la surface, le contour, la consistance des colonies pures de levures sur milieu solide YPD agar. Elle consiste également à examiner sur milieu liquide YPD bouillon la présence de dépôt au fond du tube et son aspect (fin, modéré ou épais) ainsi que la production de gaz (Guiraud, 1998).

5.2 Observation microscopique

Pour l'observation microscopique à l'état frais, une colonie pure est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur stérile et déposée sur une lame contenant une goutte d'eau distillée stérile, puis dissociée bien dans la goutte et recouverte par une lamelle. Ensuite, la lame préparée est observée au microscope optique au grossissement 400X (objectif 40) afin de déterminer l'aspect morphologique des cellules végétatives (forme, arrangement et mode de reproduction) (Bourgeois et Leveau, 1980).

6. Fermentation des sucres

Pour étudier la fermentation des sucres par les levures, les sucres suivants ont été testés : sucrose, galactose, lactose, fructose, maltose, dextrose, 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. Les tubes ont été inoculés avec 1 ml des cultures de *Saccharomyces* spp. Sélectionnés pour cette étude. Après l'incubation pendant 24 h à 35°C, la production de gaz dans la cloche de Durham est considérée comme un résultat positif indiquant la fermentation de sucre par chaque isolat testé (Negera, 2017). Notons que, une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* a été utilisée comme témoin pour la comparaison de profil de fermentation des sucres avec les différents isolats. Tous les essais sont répétés deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

7. L'activité hémolytique

Le test de l'activité hémolytique a été réalisé dans cette étude pour évaluer la pathogénicité des isolats de levures sélectionnés. 0.1 ml de chaque suspension levurine précédemment préparée a été ensemencées sur la surface du milieu de culture YPD agar contenant 7% (v/v) de sang humain. Puis les boîtes sont incubées à 35°C pendant 24h. La réaction hémolytique a été enregistré par l'observation d'une zone claire d'hydrolyse autour des colonies (β hémolyse), une zone de couleur verte autour des colonies ou hémolyse partielle (α hémolyse), pas de réaction hémolytique autour des colonies (γ hémolyse) (Foulquiè Moreno et al., 2002).

8. L'activité protéolytique

Pour étudier l'activité protéolytique des levures sélectionnées, 0.1 ml de chaque suspension de levure précédemment préparée a été ensemencées en surface sur le milieu Skim Milk agar (annexe 1). Les boîtes sont incubées à 35°C pendant 48h. Les colonies entourées d'un halo clairs sont considérées comme des isolats avec une activité protéolytique (Moradi et al., 2018).

9. L'antibiorésistance

Quatre antibiotiques ont été choisis pour tester l'antibiorésistance des *Saccharomyces* spp. Sélectionnées pour cette étude : Ampicilline (Amp, 10 μ g), Tetracycline (TE, 30 μ g), Gentamicine (Gen, 10 μ g), Erythromycine (E, 15 μ g), utilisant la méthode de diffusion en disque sur gélose décrite par Diguta, et al. (2023). 100 μ l (approximativement 10^5 UFC/ml)

de chaque culture levurinne précédemment préparée sont ensemencés en surface sur le milieu YPD agar.

Ensuite, les disques d'antibiotiques ont été déposés sur le milieu YPD agar à l'aide d'une pince stérile. Les zones d'inhibitions ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse après incubation des boîtes à 35 °C pendant 24-48 heures et les résultats de la lecture sont exprimés en millimètre (mm). Les résultats ont été notés comme suit : résistant « R » si le diamètre est ≤ 15 mm ou sensible « S » si le diamètre est > 15 mm (Diguta, et al., 2023). Notons que, chaque boîte est répétée deux fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.



Figure N° (04) : Les différents disques d'antibiotique utilisés dans cette étude

10.L'activité antibactérienne

Trois souches bactériennes de référence, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Listeria innocua* ATCC33090, ont été sélectionnées pour tester l'activité antibactérienne des différents isolats de *Saccharomyces* spp. Les différentes bactéries, proviennent de la collection ATCC (American Type Culture Collection, USA), sont cultivées dans le bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) pendant 24 h à 35°C.

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

Chaque isolat de levure ensemencés dans des tubes contenant un bouillon YPD et incubés à 35 °C pendant 24 h. Ensuite, les cultures levuriennes sont centrifugées à 12000 rpm pendant 5 min à l'aide d'une centrifugeuse (Eppendorf 5415 D, 22331Humberg) (Figure N°05), puis les surnageants obtenus ont été conservés à 4° C jusqu'à l'utilisation. 0.1ml de chaque suspension bactérienne a été ensemencée en surface sur le milieu Gélose nutritive (**annexe1**), après avoir séché les boîtes de pétri à température ambiante, des puits (diamètre de 5 mm) ont été creusés à l'aide des emboues bleus et rempli de 100 µl de suspensions levuriennes (approximativement 10⁵ UFC/ml) dans la première moitié de boîtes (**Fernandez-Pacheco et al., 2018**), alors que l'autre moitié est inoculée par de 100 µl de surnageants (**Magnusson et al., 2001**). Ensuite les boîtes sont incubées à 35 °C pendant 24 h. Les zones d'inhibitions obtenues ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les résultats de lecteur sont exprimés en millimètre (mm) comme suit :

- -, pas de zone d'inhibition (diamètre < 9 mm).
- +, faible inhibition autour des puits (diamètre >9 mm et <15 mm),
- ++, forte inhibition avec des zones claires détectables autour des puits (diamètre ≥ 15 mm)



Figure N° (05) : la centrifugeuse (Eppendorf 5415 D, 22331Humberg).



Figure N° (06) : Souche bactérienne *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

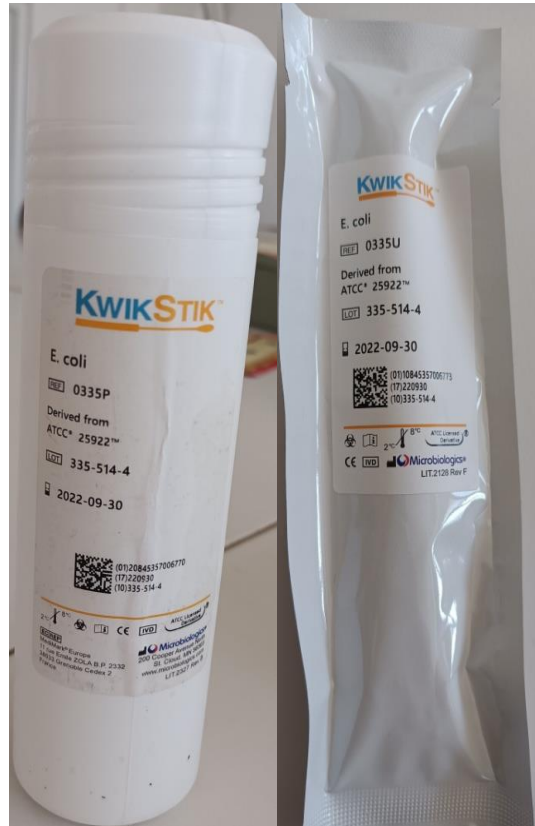


Figure N° (07) : Souche bactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922.

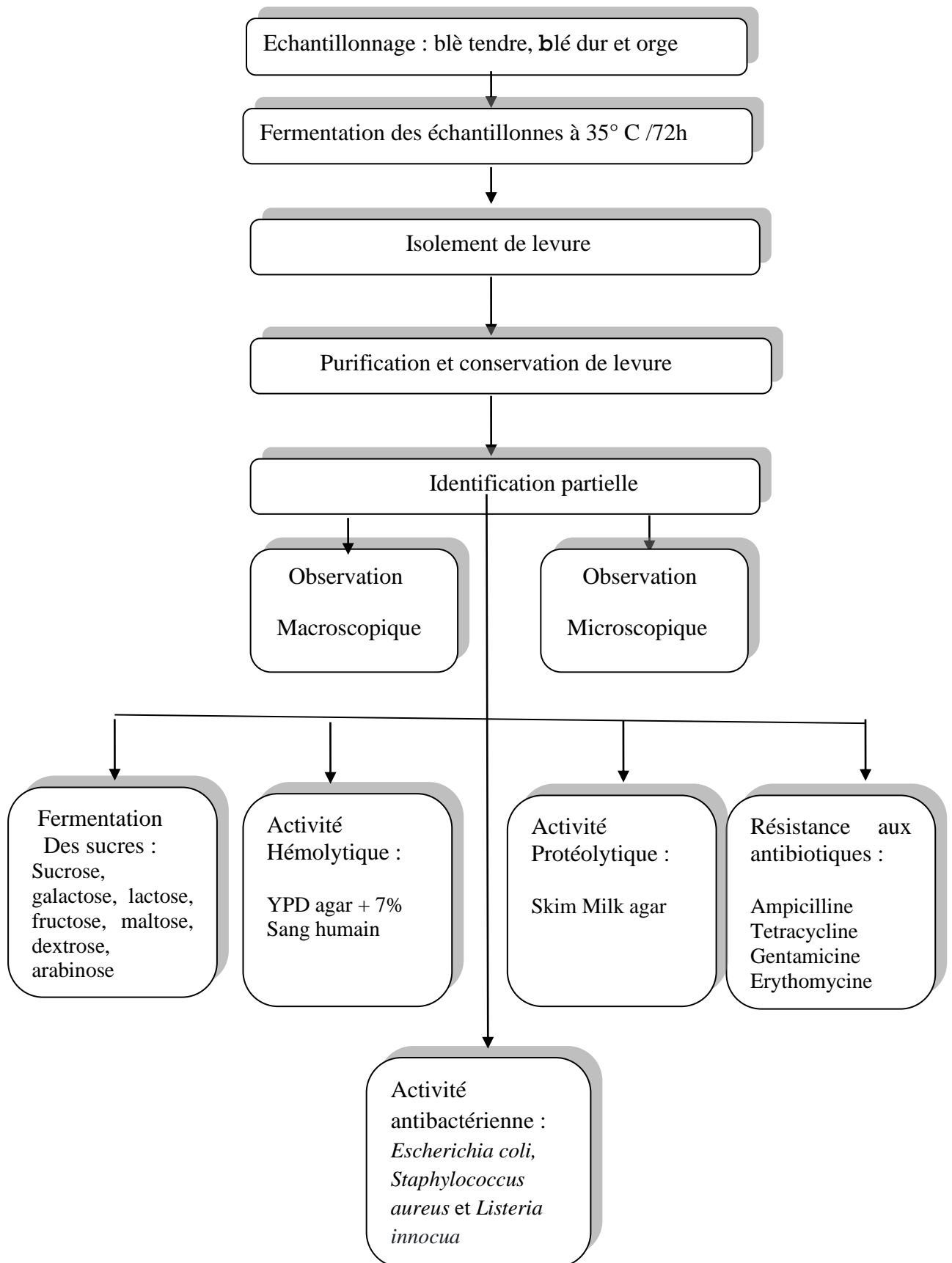


Figure N° (08) : Logigramme du Protocole expérimental de la présente étude.

Résultats
et
discussion

1. Levain

Après 72 h d'incubation à 35° C de trois variétés de farines fermentées traditionnellement, on observe un gonflement de volume, dégagement de gaz (CO₂) et changement d'odeur (Figure N°09), c'est-à-dire que l'opération de fermentation est bien déroulée.



Figure N° (09) : Résultats de la fermentation de levain.

2. Isolement des levures

L'isolement des levures à partir des trois échantillons de levain fermenté traditionnellement a permis d'obtenir dix isolats codés pour l'échantillon blé tendre : T5, TC11, TC13 et pour l'échantillon blé dur : DC2, DC3, D4, DC5, DC6, DC8 et DC9.

3. Caractéristique morphologique

3.1. Observation macroscopique :

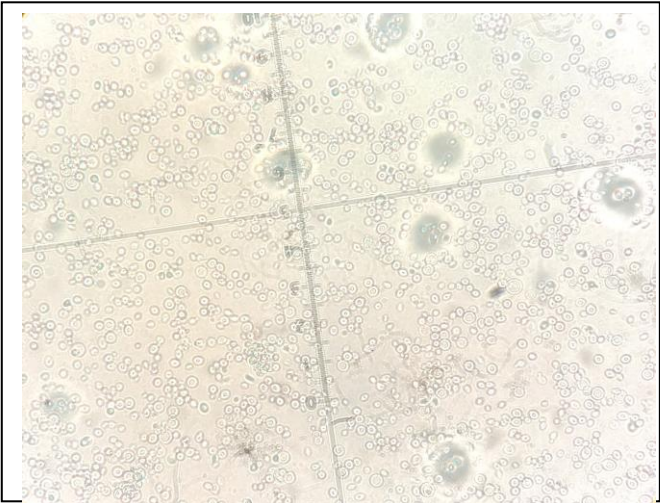
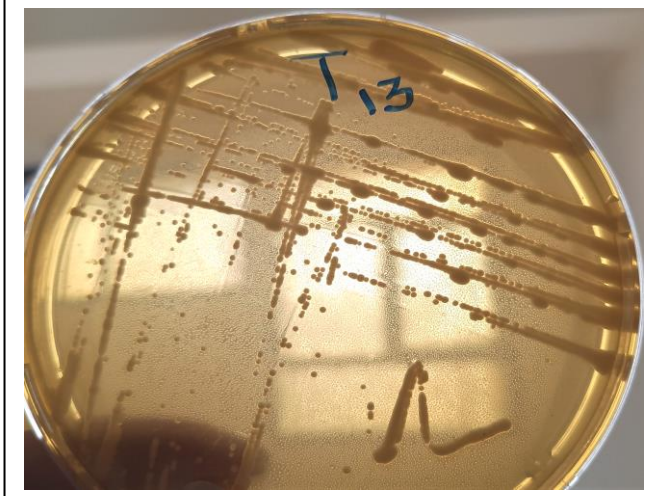
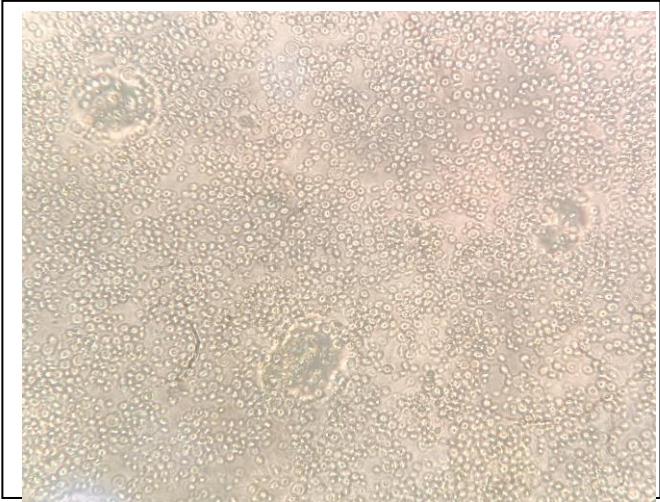
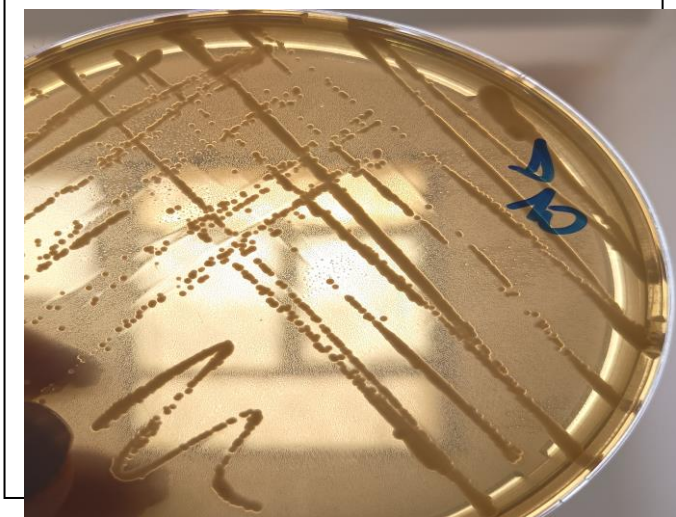
Après 24 h d'incubation à 35° C en milieu solide YPD agar, l'étude macroscopique nous a permis d'observer la forme, la couleur, la surface et la consistance des colonies purifiées (Tableau N°). Les colonies présentent une forme arrondies, à une couleur blanche avec une consistance crémeuse, un contour régulier et des reliefs bombés. Sur le milieu liquide YPD bouillon, on observe un dégagement de gaz (CO₂) et un dépôt épais au fond des tubes indiquant les caractéristiques des levures en milieu liquide.

Selon Negera (2017), qui a étudié les caractéristiques morphologiques de levures, rapporte que les colonies des levures du genre *Saccharomyces cerevisiae* sont de couleur blanche où crème avec une surface lisse et des reliefs convexes ainsi que des contours réguliers.

3.2. Observation microscopique :

L'étude microscopique de levure à l'état frais nous a permis d'observer la forme, mobilité, mode de division, mode de groupement des cellules, qui sont présentés dans le tableau (N°). Les cellules sont immobiles, isolées, possédant une forme arrondie et avec un noyau et une paroi, leur mode de division est par bourgeonnement unipolaire. La levure est un organisme eucaryote unicellulaire organisée en 16 chromosomes (**Parapouli et al., 2020**). Les levures sont des champignons unicellulaires, elles vivent sous forme de cellule isolées et qui se divise par bourgeonnement, possèdent une forme ronde et enveloppées d'une membrane épaisse (**Guilliermond, 1912**).

Tableau N° (04) : Caractéristique morphologique des isolats de *Saccharomyces* spp.

Caractéristique morphologique	
Observation microscopique (Grossissement 400X)	Observation macroscopique
<ul style="list-style-type: none"> • La forme des cellules : arrondies • Mode de division : bourgeonnement unipolaire • Mode de groupement : isolée • Mobilité : immobile • Possèdent une paroi et un noyau 	<ul style="list-style-type: none"> • La forme : arrondie • La surface : lisse • La couleur : blanche • La consistance : crémeuse • Le contour : régulier • Le relief : bombé
	
	

4. Fermentation des sucres

Dans cette étude les isolats de levure ont montré une variation dans l'assimilation des 7 sucres testés. Les résultats présentés dans le tableau (N°05) indiquent que tous les isolats de *Saccharomyces* spp. sont capable d'assimiler le fructose et incapable de fermenté l'arabinose, à l'exception de l'isolat *Saccharomyces* spp. TC11. Le sucrose et le galactose sont utilisés par l'ensemble des levures testées, à l'exception de *Saccharomyces* spp. DC5 et D4, respectivement. Cette fermentation est décelée par un dégagement de gaz (CO₂) dans les cloches de Durham. Notons également que le profil de fermentation du lactose, du dextrose, et du maltose varie considérablement entre les isolats de levures testés. Il est important de noter que l'assimilation du lactose et de l'arabinose par les *Saccharomyces* spp. est due soit d'une mutation ou d'une erreur expérimentale (par exemple le produit périmé), c'est à dire que les levures du genre *Saccharomyces* sont généralement distinguées par leur aptitude à fermenté le sucrose et le galactose, mais pas l'arabinose et lactose (Kumar et al., 2011).

Tableau N° (05) : Résultats de fermentation des sucres par les isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats / Sucres	Sucrose	Galactose	Lactose	Fructose	Maltose	Dextrose	Arabinose
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. T5	+	+	-	+	-	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp.TC11	+	+	-	+	-	+	+
<i>Saccharomyces</i> spp.TC13	+	+	-	+	-	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC2	+	+	-	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC3	+	+	-	+	+	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. D4	+	-	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC5	-	+	+	+	-	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC6	+	+	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC8	+	+	-	+	+	+	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC9	+	+	+	+	-	-	-

(-) absence de fermentation, (+) présence de fermentation

Nos résultats sont similaires des résultats de **Fakruddin et al. (2013)** qui ont testé la fermentation des onze (11) sucres différents par les levures et trouvé que la levure de genre *Saccharomyces cerevisiae* a fermentée l'ensemble des sucres dextrose, fructose, sucrose, maltose, galactose mais elle est incapable de fermenter lactose et arabinose.

5. L'activité hémolytique

Le test de l'activité hémolytique des isolats de *Saccharomyces* spp. a été réalisé sur le milieu YPD agar additionné de 7% (v/v) de sang humain où les résultats sont présentés dans le tableau (N°06). Après 24 h d'incubation à 35° C, tous les isolats de levures ne présentent aucune hémolyse (γ hémolytique) (Figure N°10), ce qui indique l'aspect non pathogène des levures isolées. Les souches probiotiques doivent être pauvres de l'activité hémolytique qui est un facteur de virulence (**Pereira et al., 2020**). Nos résultats sont semblables aux résultats de **Romero-Luna et al. (2018)** qui ont testé l'activité hémolytique des souches de levures en milieu de gélose au sang contenant 5 % (v/v) sang de mouton. Leurs résultats montrent que toutes les souches testées étaient γ hémolytique (c'est-à-dire absence d'hémolyse). **Avarez et al. (2022)** et **Pereira et al. (2020)** ont également trouvé que les levures du genre *Saccharomyce cerevisiae* ne possèdent aucune hémolyse (γ hémolytique).

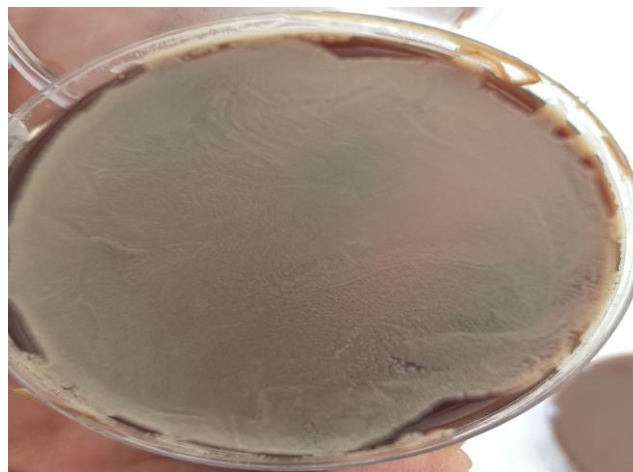


Figure N° (10) : Résultat de γ hémolyse.

6. L'activité protéolytique

L'activité protéolytique a été déterminée sur le milieu Skim Milk agar et les résultats obtenus sont affichés dans le tableau (N°06). Qu'après 48 h d'incubation à 35° C, tous les isolats sont présentés un halo clair entourant les colonies (Figure N°11), et montrant que les *Saccharomyces* spp ont dégradées la caséine présente dans le milieu de culture par l'enzyme la protéase. Le milieu Skim Milk agar sélectionné pour cette étude est un milieu efficace et rapide pour détecter les protéinases extracellulaires liées aux cellules et cette activité est détectée par une zone claire entourant les colonies (El- Ghaish et al., 2009). Des résultats similaires ont été rapportés par Moradi et al. (2018) sur des levures du genre *Saccharomyces*, montrant que cette activité est la principale réaction biochimique qui se produise pendant l'affinage du fromage (Moradi et al., 2018).



Figure N° (11) : Résultats de l'activité protéolytique de l'isolats DC2, DC6.

Tableau N° (06) : Résultats de l'activité hémolytique et protéolytique d'isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats	L'activité hémolytique	L'activité protéolytique
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. T5	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. TC11	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. TC13	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC2	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC3	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. D4	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC5	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC6	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC8	γ	+
<i>Saccharomyces</i> spp. DC9	γ	+

γ Hémolyse : absence d'hémolyse, (+) présence de l'activité protéolytique

7. L'antibiorésistance

Le test de résistance aux antibiotiques des isolats de levures a été effectué sur le milieu solide YPD agar selon la méthode de diffusion sur disque. Les résultats sont répertoriés dans le tableau (N°07). Ces derniers ont été obtenus après avoir mesuré la zone d'inhibition de chaque antibiotique à l'aide d'un pied à coulisse et noté comme suite : résistant « R » si le diamètre est ≤ 15 mm ou sensible « S » si le diamètre est > 15 mm. Tous les isolats de *Saccharomyces* ont montré une résistance à tous les antibiotiques : Ampicilline (Amp, 10 μ g), Tétracycline (TE, 30 μ g), Gentamicine (Gen, 10 μ g), Erythromycine (E, 15 μ g) sélectionnés pour cette étude (Figure N°12). La résistance aux antibiotiques est un critère important pour le choix d'un probiotique, ainsi l'antibiorésistance des levures est un caractère positif car il est lié à gènes chromosomiques non transférables aux pathogènes intestinaux (Perricone et al., 2013). Des résultats similaires ont été rapportés par Diguta et al. (2023) et Fernandez Pacheco et al. (2020) où ils ont trouvés que la levure de genre *Saccharomyces cerevisiae* est résistante aux différents antibiotiques testés. En générale, la résistance naturelle aux antibiotiques de la levure est une propriété importante pour leur utilisation comme probiotique (Poloni et al., 2017).

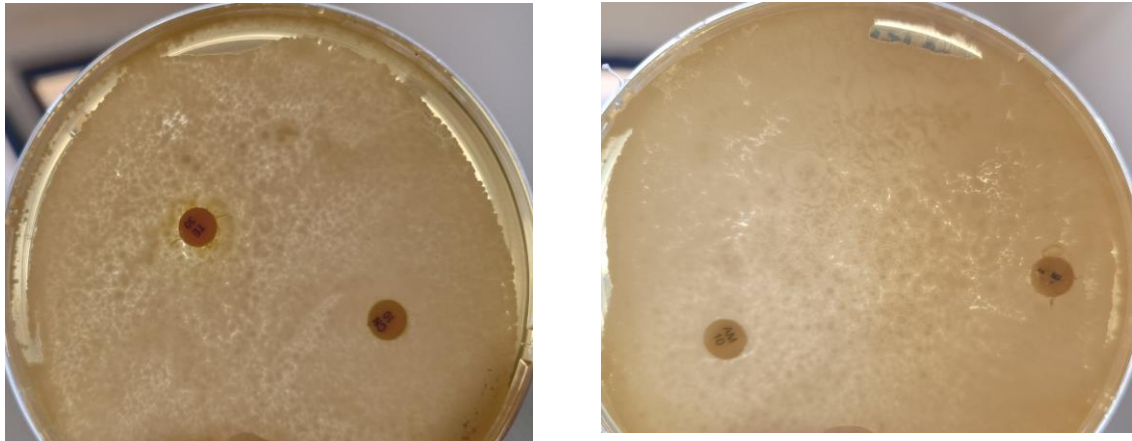


Figure N° (12) : Résultats de test de résistance aux antibiotiques d'isolats de levures.

Tableau(N°07) : Résultats de test de résistance aux antibiotiques d'isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats	Amp	TE	Gen	E
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. T5	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. TC11	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. TC13	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC2	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC3	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. D4	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC5	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC6	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC8	R	R	R	R
<i>Saccharomyces</i> spp. DC9	R	R	R	R

Amp, Ampicilline (10 µg) ; TE, Tetracycline (30 µg) ; Gen, Gentamycine (10 µg) ; E, Erythromycine (15 µg) ; R : résistant.

8. L'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des isolats de *Saccharomyces* spp a été testée vis à vis trois souches bactériennes de référence qui sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* par deux méthodes de diffusion en puits sur gélose (Figure N°13). La lecture des résultats a été faite par la mesure de diamètre des zones d'inhibition autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse et qui sont présentés dans le tableau (N°08). Une forte inhibition avec des zones claires perceptible autour des puits est enregistrée par la méthode testant les suspensions levuriennes par rapport à la méthode utilisant les surnageants levuriens indiquant que les composés antimicrobiens ne sont pas extracellulaires mais plutôt liées aux cellules (**Fakruddin et al., 2017**). Les souches *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua* ont montré une sensibilité à l'activité de tous les isolats de *Saccharomyces* spp sélectionnés, par contre une absence totale de l'activité antibactérienne des isolats de levures vis à vis la souche bactérienne de *Escherichia coli*, Gram négatif, ce qui indique que les souches bactériennes Gram positive sont plus sensibles que les souches bactériennes gram négative.

L'une de propriétés les plus recherchées des probiotiques est l'activité antibactérienne des levures contre les agents pathogènes humains (**Fakruddin et al., 2017**). Selon **Rajkouska et al., (2012)**, l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* peut limiter l'envahissement bactérien et les infections causées par des agents pathogènes humains grâce à la réduction du nombre d'organismes viables et cellules actives des bactéries et élimination des agents pathogènes lié à la surface de la levure à partir du tractus gastro-intestinal.

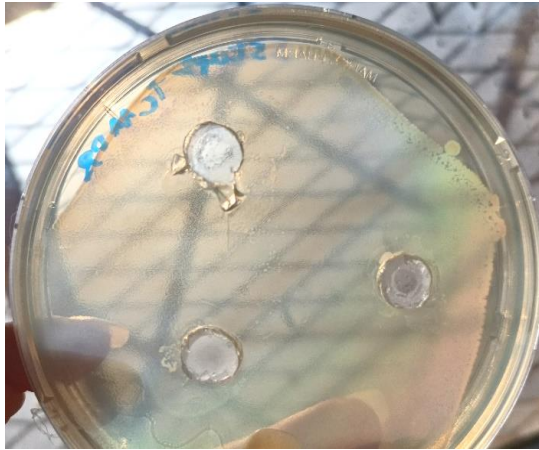


Figure N° (13) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat TC11 vis à vis *Staphylococcus*

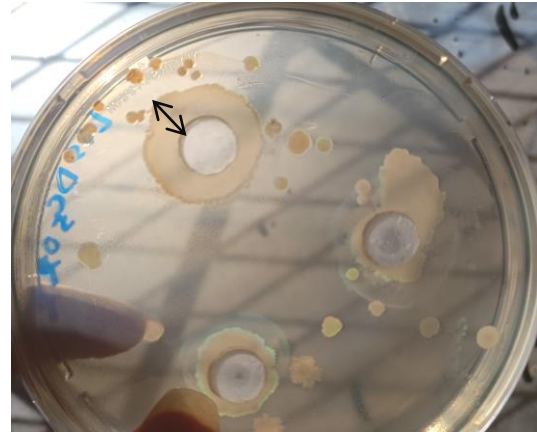


Figure N° (14) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat DC2 vis à vis *Listeria innocua*.

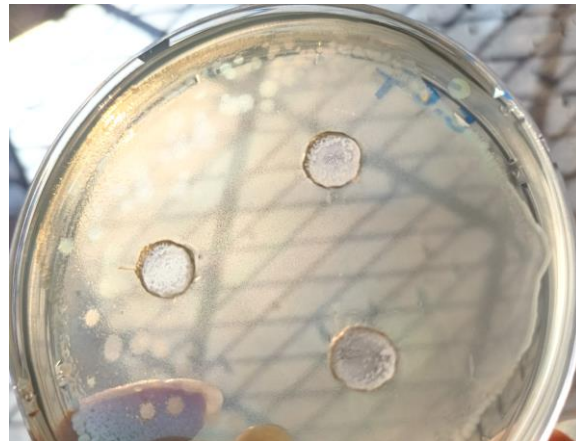


Figure N° (15) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolat témoin vis à vis *Escherichia coli*.

Tableau N° (08) : Résultats de l'activité antibactérienne d'isolats de *Saccharomyces* spp.

Isolats	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria innocua</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	Surnageant	Suspension	Surnageant	Suspension	Surnageant	Suspension
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. T5	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. TC11	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. TC13	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC2	+	++	+	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC3	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. D4	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC5	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC6	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC8	++	++	++	++	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp. DC9	++	++	++	-	-	-

(-) absence d'inhibition, (+) inhibition faible, (++) inhibition forte

Conclusion
et
Perspectives :

L'objectif principal de la présente étude est d'isoler et identifier partiellement des levures du genre *Saccharomyces* à partir de levain fermenté traditionnellement (farines céréalières). L'isolement a permis d'identifier dix (10) isolats de levures présentant des caractéristiques morphologiques identiques à celle de *Saccharomyces cerevisiae*. L'étude de la fermentation des sucres a montré que les isolats de levures sont capables d'assimiler le fructose, le sucrose et le galactose, et incapable de fermenter l'arabinose et le lactose. Le test de l'activité hémolytique des levures a montré que tous les isolats sont γ hémolytique (absence d'hémolyse). De plus, l'activité protéolytique est enregistrée pour tous les isolats de *Saccharomyces* spp. sur le milieu Skim Milk agar. Le test d'antibiorésistance a montré que tous les isolats de *Saccharomyces* sont résistants aux différents antibiotiques sélectionnés pour cette étude. L'étude de l'activité antibactérienne a permis de déterminer que les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*, Gram positif, sont sensibles à l'activité de tous les isolats de *Saccharomyces* spp. Sélectionnés, par contre une absence totale de l'activité antibactérienne des isolats de levures vis à vis la souche bactérienne *Escherichia coli*, Gram négatif

Ce travail est un point de départ pour la recherche des levures de genre *Saccharomyces* isolées à partir de levain fermenté traditionnellement afin de sélectionner des isolats probiotiques pour pouvoir être utilisés en industrie des aliments fermentés et/ou en biotechnologie. Néanmoins, cette étude nécessite d'être poursuivi par d'autres études plus approfondies et qui peuvent être envisagées comme perspectives :

- ❖ Confirmer génotypiquement les différents isolats de *Saccharomyces* spp.,
- ❖ Etudier d'autres aspects sécuritaires et technologiques des isolats de levures tels que l'absence de gènes de virulence, la résistance aux sels biliaires et au pH acide, la tolérance à l'éthanol,
- ❖ Incorporer des isolats de levures sélectionnés dans des matrices alimentaires, afin de déterminer les changements organoleptiques des produits fermentés (saveur, odeur et texture).
- ❖ Évaluer le pouvoir biotechnologique des isolats de levures, comme la production de composés actifs, bioéthanol et des enzymes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

- Alvarez, S. C. V., Alaniz, M. J. L., Furlani, M. V. M., Vazquez, F., Agresti, P. M., Nally, M. C., & Maturano, Y. P. (2023). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genetics and Biology*, *164*, 103767.
- Ardiani, A., Higgins, J. P., & Hodge, J. W. (2010). Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS yeast research*, *10*(8), 1060-1069.
- 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
- Baniwal, P., Mehra, R., Kumar, N., Sharma, S., & Kumar, S. (2021). Cereals: Functional constituents and its health benefits. *The Pharma Innovation*, *10*(2), 343-349.
- Bourgeois, C. M., & Larpent, J.P. (1996). Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Ed © Technique Documentation Lavoisier, Paris.
- Corsetti, A., & Settanni, L. (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, *40*(5), 539-558.
- Corsetti, A. (2012). Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 85-103). New York, NY: Springer US.
- Chavan, R. S., & Chavan, S. R. (2011). Sourdough technology—a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(3), 169-182.
- Diguță, C. F., Mihai, C., Toma, R. C., Cîmpeanu, C., & Matei, F. (2023). *In Vitro* Assessment of Yeasts Strains with Probiotic Attributes for Aquaculture Use. *Foods*, *12*(1), 124.
- De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, *16*(1-3), 43-56.
- De Llanos, R., Llopis, S., Molero, G., Querol, A., Gil, C., & Fernandez-Espinar, M. T. (2011). In vivo virulence of commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains with pathogenicity-associated phenotypical traits. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 393-399.
- El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J. M. (2010). Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research and Technology*, *230*, 635-643.

- Foulquié Moreno, M. R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., & De Vuyst, L. (2003). Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 214-229.
- 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., Islam, M. A., Quayum, M. A., Ahmed, M. M., & Chowdhury, N. (2013). Characterization of stress tolerant high potential ethanol producing yeast from agro-industrial waste. *Am J Biosci*, 1(2), 24-34.
- 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.
- Fredot, E. (2005). *Connaissance des aliments: [bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique]*. Tec et Doc.
- Guilliermond, A. (1912). *Les levures* (Vol. 9). O. Doin et fils.
- Guiraud J. P. (1998.) *Microbiologie alimentaire*. Dunod, PP: 320-652.
- Gobbetti, M. (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), 267-274.
- Jakobsen, M., Cantor, M. D., & Jespersen, L. (2002). Production of bread, cheese and meat. *Industrial Applications*, 3-22.
- Kumar, R. S., Shankar, T., & Anandapandian, K. T. K. (2011). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2(10), 399-405.
- Koehler, P., & Wieser, H. (2012). Chemistry of cereal grains. In *Handbook on sourdough biotechnology* (pp. 11-45). New York, NY: Springer US.
- Kreger-van Rij, N. J. W. (1984). *Yeasts* (pp. 45-103). Amsterdam: Elsevier.
- Lara-Hidalgo, C. E., Hernández-Sánchez, H., Hernández-Rodríguez, C., & Dorantes-Álvarez, L. (2017). Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin J Nutr Metab*, 4(1), 1045.
- Mounir, M., Belgire, M., Lahnaoui, S., Hamouda, A., Thonart, P., Delvigne, F., & Ismaili Alaoui, M. (2016). Maîtrise de la fermentation alcoolique sous stress éthanolique, thermique et osmotique de la souche *Saccharomyces cerevisiae* YSDN1

en vue de la préparation du vinaigre de fruits. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 4(2).

- Moradi, R., Nosrati, R., Zare, H., Tahmasebi, T., Sadari, H., & Owlia, P. (2018). Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* strains. *Iranian Journal of Microbiology*, 10(2), 123.
- 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.
- McKevith, B. (2004). Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29(2), 111-142.
- Negera, T. (2017). Isolation and Characterization of Ethanol, Sugar and Thermo Tolerant Yeast Isolates in Ethiopia. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 5, 4-10.
- Pereira, R. P., Jadhav, R., Baghela, A., & Barretto, D. A. (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.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, 6(1), 1.
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35.
- Rajkowska, K., & Kunicka-Styczyńska, A. (2012). Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* against human pathogens. *Food Technology and Biotechnology*, 50(2), 230-236.
- Romero-Luna, H. E., Hernández-Sánchez, H., Ribas-Aparicio, R. M., Cauich-Sánchez, P. I., & Dávila-Ortiz, G. (2019). Evaluation of the probiotic potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) isolated from Tibicos by *in vitro* studies. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11, 794-800.
- Spencer, J. F. T., & Spencer, D. M. (1997). Historical Introduction: Yeasts and Man in the Past. *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*, 2-10.
- Spencer, J. F. T., & Spencer, D. M. (1997). Taxonomy: the names of the yeasts. *Yeasts in natural and artificial habitats*, 11-32.

- Sidhu, J. S., Kabir, Y., & Huffman, F. G. (2007). Functional foods from cereal grains. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 231-244.
- Šramková, Z., Gregová, E., & Šturdík, E. (2009). Chemical composition and nutritional quality of wheat grain. *Acta chimica slovacica*, 2(1), 115-138.
- Ulacio, D., Pérez, C., & Pineda, J. (1997). Micoflora asociada a las raíces de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) provenientes del estado Portuguesa. *Bioagro*, 9(1), 3-11.
- Umeh, S. O., Agwuna, L. C., & Okafor, U. C. (2017). Yeasts from Local Sources: An Alternative to the Conventional Brewer's Yeast. *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 30, 191-195.
- Vogel, R. F., Müller, M., Stolz, P., & Ehrmann, M. A. (1996). Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. *Adv. Food Sci.*, 18, 152-159.
- 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.
- Walker, G. M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Yazar, G., & Tavman, Ş. (2012). Functional and technological aspects of sourdough fermentation with *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Food Engineering Reviews*, 4, 171-190.

Annexes

❖ Milieu YPD bouillon (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) :

- 1% Extrait de levure
- 2% Peptone
- 1% Dextrose

❖ Milieu YPD agar :

- 1% Extrait de levure
- 2% Peptone
- 1% Dextrose
- 1.7% Agar-Agar

❖ Milieu Skim Milk agar :

- 50% de 2.5% solution d'agar stérile
- 50% Lait écrémé