

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



Université ABBES LAGHROUR Khenchela

Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie moléculaire et Cellulaire

جامعة عباس لغرور خنشلة
كلية العلوم الطبيعية و الحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية



N° Série :.....

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Science de la nature et de la vie**

Filière : **Biologie**

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Thème

**Contribution à la caractérisation de levures
antagonistes isolées à partir de beurre
traditionnel de la région de Khenchela**

Présenté par :

ABIDI Chahra et LAOUAR Aya

Jury de Soutenance :

Présidente **LEULMI. N.** (MCB) Univ. Abbés Laghrou-Khenchela.

Encadrante : **MERABTI. R.** (MCA) Univ. Abbés Laghrou-Khenchela.

Examineur : **THABET. R.** (MAA) Univ. Abbés Laghrou-Khenchela.

2019/2020

Remerciement

Nous tenons à remercier ALLAH tout puissant qui nous a donné la santé, le courage, et la volonté pour réaliser ce travail

Nous tenons à remercier Dr. Merabti Ryma, d'avoir encadré et suivi ce travail, et pour tous ses conseils et surtout sa disponibilité malgré la pandémie du Covid-19 qui nous a empêchées de nous rencontrer, et qui, en tant qu'encadrante, s'est toujours montrée à l'écoute, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous adressons nos plus sincères remerciements aux examinateurs, pour avoir accepté de juger ce travail, et qui nous font l'honneur d'être membres de ce Jury.

Nous exprimons aussi notre grande gratitude envers toutes les personnes, ayant contribué de prêt ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail

Aussi tous les professeurs qui ont eu à nous enseigner et à nous prodiguer de bon conseil durant notre parcours universitaire.

Nos remerciements vont également à tout le personnel du département de biologie moléculaire et cellulaire pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Nos très chères mères,

Nos très chers pères,

Nos frères et Nos sœurs,

Et à tous nos collègues de promotion,

ABIDI Chahra

LAOUAR Aya

Table de Matières

Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Résumé.....	
Abstract.....	
الملخص.....	
INTRODUCTION GENERALE :	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	

Chapitre 1: LES LEVURES

1. LES LEVURES :	5
1.1. Généralité :	5
1.2. Habitat et Morphologie :	5
1.3. Le Métabolisme :	6
1.3.1. La respiration :	6
1.3.2. La fermentation alcoolique:.....	6
1.4. Taxonomie et classification :	7
1.5. Isolement et identification des levures :	9
1.5.1. Milieux de culture des levures :	9
1.5.2. Identification des levures :	9
1.6. Les applications des levures :	10

Chapitre 2 : LES PRODUITS LAITIERS FERMENTES

2. LES PRODUITS LAITIERS FERMENTES :	12
2.1. Le lait :	12
2.2. La microbiologie du lait :	12
2.2.1. Microflore du lait :	12
2.2.2. La flore de contamination	13
2.2.3. La flore d'altération :	13
2.2.4. La flore pathogène :	13
2.3. Produits laitiers fermentés :	15

2.3.1. Le lait fermenté :	15
2.3.2. Le yaourt :	16
2.3.3. Le fromage :	16
2.3.4. Le beurre :	16

Chapitre 3: LES LEVURES COMMES DES AGENTS DE BIOCONTROLE ET DE BIOCONSERVATION

3. LES LEVURES COMMES DES AGENTS DE BIOCONTROLE ET DE BIOCONSERVATION :	19
3.1. Introduction :	19
3.2. Application des levures dans la bioconservation et le biocontrol :	19
3.3. L'activité anti microbienne et anti fongique des levures :	20
3.3.1. Définition sur les levures à toxine :	20
3.3.2. La Production des toxines :	21
3.3.3. Les mécanismes des toxines tueuses :	21

REVUE EXPERIMENTALE

1. Matériels et Méthodes

1.1. Échantillonnage :	23
1.2. Isolement :	23
1.3. Purification et sélection des isolats :	23
1.4. Conservations des levures :	23
1.5. Identification :	24
1.5.1. Les caractères culturaux (macroscopiques):	24
1.5.2. Les caractères microscopiques:	24
1.5.3. Caractéristiques biochimiques et physiologiques:	25
1.6. Détermination de l'activité antifongique des levures :	26
1.6.1. Préparation des souches test :	26
1.6.2. Détermination de pouvoir d'antagonisme des levures :	27

2. Résultats et Discussion

2.1. Dénombrement :	29
2.1.1. Identification:	29
2.3. L'activité antagoniste des levures :	30
2.4. Conclusion générale :	34

Références Bibliographique :.....	36
Annexes :.....	51

Abréviation

%	: Pourcent.
°C	: degré Celsius.
µm	: micro mètre.
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adenosine tri-phosphate.
CYA	: Czapek Yeast Agar.
D1/D2	: Domaine 1/ Domaine 2.
g	: gramme.
h	: heure.
ITS	: Internal transcribed spacer.
K⁺	: Potassium cation /Potassium (+) / Potassium ion.
KNO₃	: Nitrate de potassium.
LAB	: Bactéries d'acide lactique.
MA	: l'extrait de malt agar.
MA	: Malt Agar.
MEA	: Malt Extract Agar.
ml	: millilitre.
NH₄⁺	: Ammonium ion / Ammonium +.
NTS2	: Non transcribed spacers 2.
PCR	: Polymerase Chain Reaction.
PDA	: Potato Dextrose Agar.
rDNA	: ribosomal DNA.
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism.
UFC	: Unité Formant Colonies.
YCB	: Yeast Carbon Base.
YNB	: Yeast Nitrogen and carbon Base.
YPG	: Yeast Peptone Glucose.
YPGA	: Yeast Peptone Glucose Agar.

Liste des Figures

- Figure 1:** Division d'une cellule de levure par bourgeonnement (Madigan et Martinko, 2007).....6
- Figure 2:** Présentation d'une cellule de levure (Manyri, 2005).....6
- Figure 3:** Fermentation alcoolique et étapes enzymatiques au sein de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira et al., 2013).....7
- Figure 4:** Interaction de levure contre *Aspergillus. carbonarius* pendant le stockage à 25 °C sur MEA (Malt Extract Agar) après 3, 5 et 7 jours. *Aspergillus. carbonarius* (C) avec levures inoculées dans les lignes R: *Rhodotorula. mucilaginosa*, D: *Dekkera. bruxellensis*, et Smix: culture combinée de 10 souches de *Saccharomyces. cerevisiae* (Tryfinopoulou et al., 2020).....33
- Figure 5:** *Aspergillus. carbonarius* (C) inoculée sur CYA (Czapek Yeast Agar) à 25 °C pendant 7 jours avec différentes espèces de levure. Pmix: culture combinée de 4 souches de *Pichia. spp*, Smix: culture combinée de 10 souches de *Saccharomyces. cerevisiae*, R: *Rhodotorula. mucilaginosa*, et D: *Dekkera. bruxellensis* (Tryfinopoulou et al., 2020).....33

Liste des Tableaux

- Tableau 1** : Classification des levures (Kreger-Van, 1984).....8
- Tableau 2** : Nombre moyen des levures de beurre provenant du lait de chamelle recueillis dans quatre régions du Sahara algérien (Kacem et Karam, 2006).....29
- Tableau 3** : Exemples de levure tueuses et mécanismes antagonistes dans les applications d'aliments et de boissons transformés (Muccilli et Restuccia, 2015).....31

Résumés

Résumé

Les aliments ou les boissons fermentés sont obtenus par fermentation du produit alimentaire jusqu'à un niveau d'exigence souhaité. La fermentation est issue des microorganismes tels que des bactéries, des levures ou des moisissures. Plus de 3 500 aliments fermentés existent dans le monde entier. Les plus connus sont les pains, les yaourts et les fromages et le beurre, grâce à la fermentation, ces aliments sont plus nutritifs, plus savoureux et plus faciles à digérer. De plus, cette fermentation améliore la sécurité alimentaire, en aide à conserver les aliments et à augmenter leur durée de vie. Dans cette étude bibliographique nous nous sommes intéressés aux levures isolées à partir de *smen/dhan* (beurre fermenté traditionnel) commercialisé dans la wilaya de Khenchela et à leurs propriétés antagonistes vis-à-vis des souches de moisissures responsables d'altération alimentaire. Les études réalisées montrent que le beurre fermenté traditionnellement (*smen /dhan*) constitue un véritable réservoir de flore levurienne avec un fort potentiel d'utilisation dans l'industrie agroalimentaire comme agents de biocontrôle et bioconservation.

MOTS CLÉS : levures, beurre, antagonisme, moisissure, biocontrôle- bioconservation

Abstract

Fermented foods or beverages are obtained by fermenting products to a desired level of requirement. Fermentation comes from microorganisms such as bacteria, yeast or mold. There are more than 3,500 fermented foods worldwide and the best known are breads, yoghurts and cheeses and butter. These foods are more nutritious, tastier and easier to digest. In addition, the fermentation improves foods safety; helps conserve food and increase their shelf life. In this bibliographical study we looked at yeasts isolated from *smen/dhan* (traditional fermented butter) marketed in the wilaya of Khenchela (Algeria) and their antagonistic properties against moulds strains that cause food alteration. Studies show that traditionally fermented butter (*smen/dhan*) is a good reservoir of yeast flora with a high potential for use in the argolimentary industry as biocontrol and bioconservation agents.

KEY MOTS: yeast, butter, antagonism, mold, biocontrol- bioconservation

الملخص

يتم الحصول على الأطعمة المخمرة أو المشروبات عن طريق تخمير المنتج الغذائي إلى المستوى المطلوب. التخمير يحدث بفضل الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا الخميرة أو العفن. هناك أكثر من 3500 من الأطعمة المخمرة في جميع أنحاء العالم. أشهرها هي الخبز والزيادي والجبن والزبدة ، وهذه الأطعمة هي الاطعمة الأكثر تغذية، وتكون ألد وأسهل للهضم. بالإضافة إلى ذلك التخمير يحسن سلامة الأغذية، و يحافظ على الاغذية و يزيد في عمرها. في هذه الدراسة البيولوجرافية (النظرية) نظرنا إلى الخمائر المعزولة عن السمن / الدهان (الزبدة المخمرة التقليدية) التي تم تسويقها في ولاية خنشلة وخصائصها الغذائية ضد سلالات العفن التي يمكن ان تسبب تغيير في صحة و نوعية الغذاء. وتشير الدراسات إلى أن الزبدة المخمرة تقليديا (*smen/dhan*) هي خزان حقيقي للسلالة الخميرة اضافة إلى إمكانيتها العالية للاستخدام في الصناعة الزراعية الغذائية في شكل عوامل حيوية للمكافحة و الحفظ البيولوجي

الكلمات الرئيسية : الخميرة , الزبدة , العفن , المكافحة البيولوجية- الحفظ البيولوجي

Introduction générale

Introduction générale

Durant les trois dernières décennies, les microorganismes ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels et en particulier agroalimentaires. Diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites (Ibukun et Akindumila, 1998 ; Abu et al., 2005).

Les bactéries fermentent généralement le lait mais, parfois, les levures se trouvent dans les laits fermentés. La présence de ces levures dans la communauté microbienne de certains laits fermentés pourrait être intentionnelle ou accidentelle (Maïworé et al., 2019). Les levures occupent une place essentielle dans l'industrie alimentaire. Elles participent à l'élaboration de nombreux produits alimentaires (panification, fromagerie, brasserie,) et dans la production des enzymes (l'invertase, lactase, lipase et les amylases) (Simon et Meunier, 1970), du glycérol ainsi que certaines vitamines et solvants, mais aussi à la revalorisation de déchets agricoles, industriels et à la production des protéines (Scriban, 1984 ; Leclerc et al., 1995).

La fermentation des aliments est l'une des premières méthodes connues par l'homme utilisée dans la transformation et la conservation des aliments. Il s'agit d'un processus métabolique réalisé par les levures ou les bactéries qui convertissent le sucre en acide organiques, alcools et dioxyde de carbone, sous condition anaérobie. Les métabolites produits pendant la fermentation peuvent alors améliorer la saveur et la valeur nutritive, ainsi que la durée de vie des denrées alimentaires (Caplice et Fitzgerald, 1999). La fermentation par micro-organismes pourrait également enrichir le produit, en fournissant une excellente source composés bioactifs bénéfiques pour la santé.

Il est largement reconnu que la qualité globale des produits dans les industries, telles que la vinification, la production de saucisses et de produits laitiers, la cuisson, etc., est principalement corrélée avec le développement de micro-organismes de détérioration (Du Toit et Pretorius, 2000 ; Sperber et Doyle, 2009). Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont porté sur l'application de starters antagonistes de levures dans divers processus alimentaires et de boissons pour améliorer leur sécurité et leurs qualités sensorielles, respectivement, par l'inhibition des organismes pathogènes et de détérioration, alors les levures pourraient être utilisées comme agent de biocontrôle et de bioconservation (Muccilli et Restuccia, 2015).

Le lait se prête à de très nombreuses transformations et donne la naissance à des produits laitiers qui sont au cœur de notre alimentation : laits, fromages, yaourts, beurres, crèmes, desserts lactés et autres produits laitiers font ainsi partie de notre quotidien et contribuent, sous des formes variées et riches en goût, à l'équilibre alimentaire à chaque âge de la vie (Kyung et Orger, 2016).

L'Algérie est un pays traditionnellement consommateur de produits laitiers fermentés, qui étaient jusqu'à une date récente fabriqués en milieu rural, principalement au niveau des ménages, par fermentation spontanée des lait crus produits localement (Benkeroum et Tamines, 2004). Parmi ces produits, le beurre fermenté « *Smen/ dehan* » fabriqué à partir de lait cru non pasteurisé et dont la fermentation peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années selon les traditions régionales (Bensalah et al., 2011).

Dans le présent travail, nous avons choisi de nous intéresser à certaines caractéristiques technologiques, notamment antagonistes, des levures présentes dans des échantillons de beurre fermenté élaboré dans la région de Khnechela. L'objectif était d'évaluer et de mettre en évidence l'activité antifongique des levures afin de sélectionner les isolats à potentiel antagoniste pour une éventuelle utilisation comme agents de biocontrôle et/ou de bioconservation. Cependant, à cause de la pandémie de la COVID19 et de l'annulation des travaux pratiques au niveau des laboratoires pédagogiques, le mémoire est présenté sous forme d'une revue bibliographique et expérimentale.

Chapitre 1

1. LES LEVURES

1.1. Généralité :

Le terme levure provient du mot latin « *levare* » qui se traduit par le verbe « lever » comme levain (Gyang, 1984), et sont des champignons unicellulaires eucaryotes qui se reproduisent par bourgeonnement (reproduction végétative ; asexuée) qui est la forme majeure de multiplication (Kreger-Van, 1984; Larpent, 1997; Bonaly, 1991).

Les levures utilisent comme source de carbone les glucides, les lipides, les protéines et les acides nucléiques pour la biosynthèse des constituants cellulaires et leurs oxydation fournit l'énergie à la cellule (Larpent, 1991). Aussi, elles peuvent utiliser des sources non conventionnelles comme l'éthanol et le glycérol (Tamaki et Hama, 1982). Les levures ont besoin également de source d'azote dans la synthèse des protéines, des acides nucléiques et des vitamines. Les sels d'ammonium ou de nitrate sont souvent utilisés comme source d'azote inorganique et les acides aminés comme source d'azote organique. Ces derniers sont présents dans la farine de soja, le peptone, l'extrait de levure... etc. (Walker et al., 1995). De plus, certaines levures ont besoins des oligo-éléments et des facteurs de croissance en faible concentration indispensables à leur croissance.

Les températures de croissance des levures varient entre 25 et 30 °C. Toutefois, ces températures ne sont pas des températures optimales que les levures trouvent dans certains habitats (Vishniac et Hempfling, 1979). Elles présentent également une tolérance élevée aux pH extrêmes (de 2,4 à 8,6) (Bouix et Leveau, 1991). Selon les facteurs environnementaux les levures peuvent utiliser la respiration ou la fermentation pour produire de l'énergie (Walker et al., 1997).

1.2. Habitat et Morphologie :

Les cellules des levures sont généralement ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques, allongées, apicules, ogivales ou en forme de bouteille (Leveau et Bouix, 1993 ; Larpent, 1997). La taille des levures varie considérablement en fonction des espèces et de l'environnement elle est généralement comprise entre 10 et 50 µm. La paroi cellulaire elle-même a une épaisseur d'environ 100 à 200 nm et représente 15 à 25% du poids sec d'une cellule. 80 à 90% des polysaccharides qui la composent, en association avec quelques protéines, sont : le glucane, le phosphomannane et la chitine.

Les levures se trouvent généralement dans le sol ou associées aux plantes, champignons, animaux ou bien sur les végétaux riches en sucre (Bouix et Leveau, 1991).

Elles sont aussi présentes dans la mer et les eaux douces associées au plancton (Van Uden et Fell, 1968 ; Ahearn, 1973).

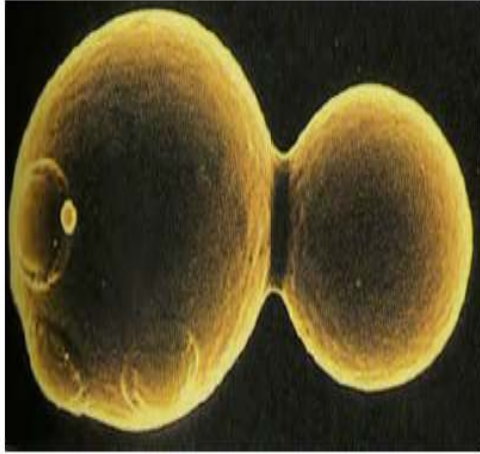


Figure 1: Division d'une cellule de levure par bourgeonnement (Madigan et Martinko, 2007)

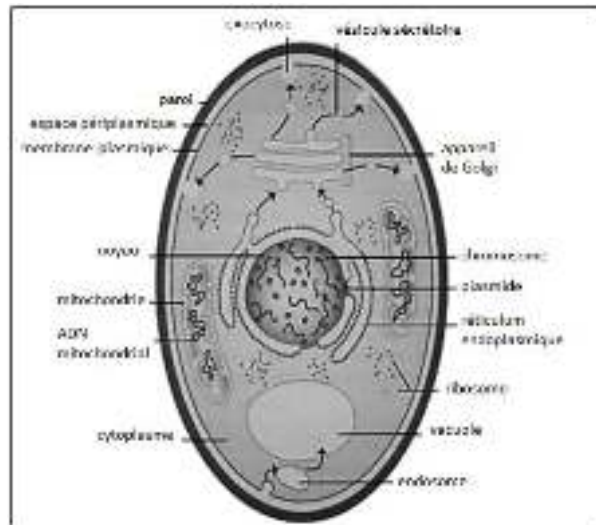


Figure 2: Présentation d'une cellule de levure (Manyri, 2005)

1.3. Le Métabolisme :

Les levures sont des organismes hétérotrophes, ce qui signifie qu'ils ont besoin des substrats organiques dans leur environnement afin de se développer pour produire de l'énergie. Elles utilisent deux processus différents : la respiration (aérobie) et la fermentation alcoolique (anaérobie).

1.3.1. La respiration :

Les levures utilisent la respiration en milieu aérobie (présence de dioxygène). Ce métabolisme sert à produire des molécules d'ATP (adénosine tri-phosphate), source d'énergie assimilable obtenue à partir de l'oxydation du glucose. La respiration cellulaire se déroule en 3 grandes étapes enzymatiques : la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons, liée à la phosphorylation oxydative (Ostegaard et al., 2000).

L'équation bilan de la respiration cellulaire est :



1.3.2. La fermentation alcoolique:

Elle est utilisée pour la fabrication du vin, de la bière, et la formation des composées organoleptiques en plus de l'éthanol (Guiraud, 1998). Lorsque le milieu est dépourvu de

dioxygène, les levures utilisent la fermentation alcoolique. La première étape de la fermentation alcoolique est la même que celle de la respiration : c'est la glycolyse. La molécule de glucose est donc dégradée en 2 molécules de pyruvate, mais cette fois-ci, les molécules de pyruvate restent dans le cytosol, où elles vont être partiellement dégradées en alcool (éthanol) et en CO₂.

L'équation bilan de la fermentation est :

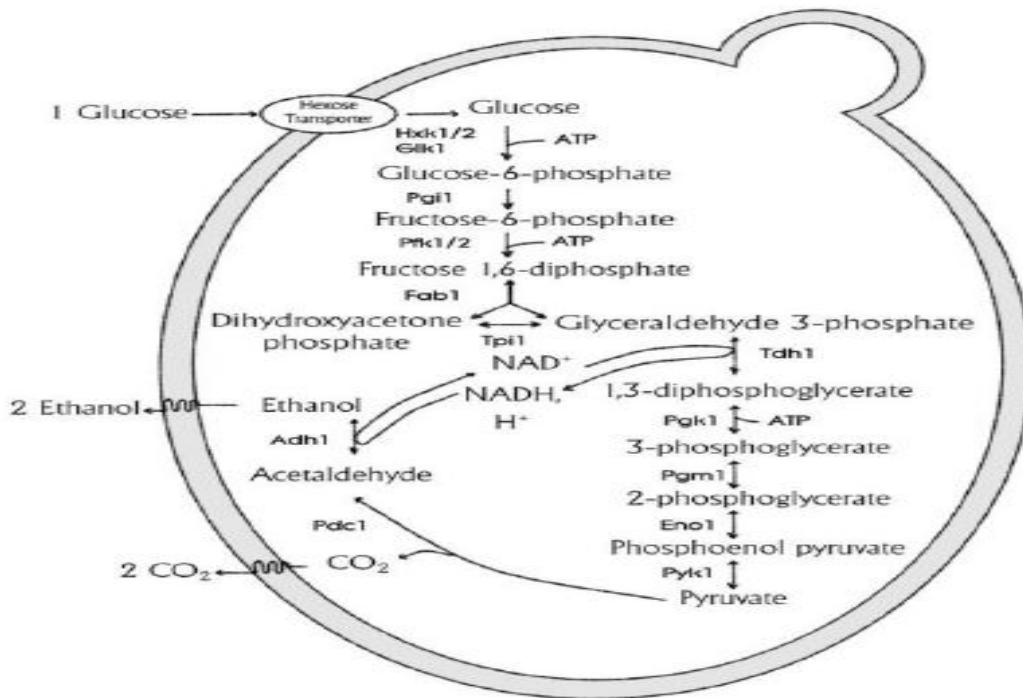
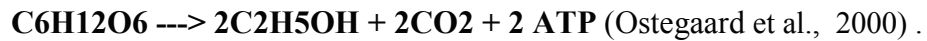


Figure 3: Fermentation alcoolique et les étapes enzymatiques au sein de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira et al., 2013).

1.4. Taxonomie et classification :

Les règles de taxonomie des levures et autres champignons relèvent de l'autorité du code international de nomenclature botanique. La version la plus récente du code (Mc Neill et al., 2006) a été adoptée au dix-septième congrès botanique international, Vienne, Autriche, 2005 (<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>). Les 3 grandes classes des levures sont :

- **Les ascomycètes :** sont endogènes et de multiplication sexuée et donnent une ascospore.
- **Les basidiomycètes :** sont exogènes et de multiplication sexuée et donnent une basidiospore ou ballistospore.

- **Les deutéromycètes ou levures imparfaites** : sont de multiplication asexuée = végétative = bourgeonnement.

Tableau 1: Classification des levures (Kreger-Van, 1984)

Les levures ascomycètes	Les levures basidiomycètes	Les levures imparfaites
Saccharomycetaceae 1. Schizosaccharomycetoidea <i>Schizosaccharomyces</i> 2. Saccharomycetoidea <i>Ambrosiozyma</i> <i>Arthroascus</i> <i>Arxiozyma</i> <i>Citeromyces</i> <i>Clavispora</i> <i>Cyniclomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Guilliermonedella</i> <i>Hansenula</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Lodderomyces</i> <i>Pachysolen</i> <i>Pachytichospora</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomycopsis</i> <i>Schwanniomyces</i> <i>Sporopachydermia</i> <i>Stephanoascus</i> <i>Torulaspora</i> <i>Wickerhamiella</i> <i>Wingea</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> 3. Lipomycetoidea <i>Lipomyces</i> 4. Nadsonioidea <i>Hanseniaspora</i> <i>Nadsonia</i> <i>Saccharomycodes</i> <i>Wickerhamia</i> 5. Spermophthoraceae <i>Coccidiascus</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Nematospora</i>	Levures formant des teliospores <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospordium</i> <i>Sporidiobolus</i> Filobasidiaceae <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> Levures non classées <i>Sterigmatosporidium</i>	Sporobolomycetaceae <i>Bullera</i> <i>Sporobolomyces</i> Cryptococcaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Eeniella</i> <i>Fellomyces</i> <i>Kloeckera</i> <i>Malassezia</i> <i>Oosporidium</i> <i>Phaffia</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Schizoblastosporion</i> <i>Sterigmatomyces</i> <i>Sympodiomyces</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>

1.5. Isolement et identification des levures :

1.5.1. Milieux de culture des levures :

Les levures sont isolées à partir d'un large éventail de milieux aquatiques, marins, atmosphériques et les habitats terrestres. De nombreuses levures se produisent largement, alors que certains semblent confinés à des habitats spécifiques. Les levures sont rarement isolées en l'absence de moisissures ou de bactéries. Par conséquent, des techniques sélectives sont souvent utilisées pour l'isolement, en utilisant des milieux qui permettent aux levures de se développer, tout en supprimant les moisissures et les bactéries. Ces milieux exploitent le fait que les levures sont généralement capables de se développer à des niveaux de pH et d'activité de l'eau qui réduisent ou inhibent la croissance des bactéries. Les milieux peuvent également inclure des antibiotiques ou des agents fongicides pour la suppression des moisissures (Kurtzman et al., 2011).

1.5.2. Identification des levures :

Les critères de classification des levures comprennent: a) la taille et la forme de leurs cellules; b) les structures pariétales; c) les modes de reproduction végétative; d) s'ils se reproduisent ou non sexuellement et, si oui, leur mode de reproduction sexuelle; et (e) leur capacité à utiliser divers composés exogènes. De plus, à partir des années 1970, les caractéristiques génotypiques sont devenues de plus en plus utilisées et primordiales dans l'identification.

- **Identification phénotypique :**

La classification phénotypique utilise des caractères considérés comme importants (Bouix et Leveau, 1991 ; Larpent, 1991 ; Guiraud, 1998):

- les caractères culturels macroscopiques et microscopiques ;
- les caractéristiques physiologiques ;
- le mode de reproduction ;
- la formation des ascospores ;
- l'aptitude de filamentation ;
- les besoins nutritionnels et énergétiques ;
- l'utilisation des sources de carbones ou d'azote ;

- **Identification moléculaire :**

La taxonomie conventionnelle est fondée sur la modalité de reproduction sexuelle, si elle est présente, sur la morphologie des cellules et sur les caractéristiques physiologiques et biochimiques. Les tests sont longs et laborieux et trois semaines sont souvent nécessaires pour obtenir les résultats complets. Ces dernières années, les temps demandés pour l'identification des levures ont été réduits par l'introduction de techniques moléculaires appliquées à l'étude des chromosomes entiers ou à l'analyse de domaines spécifiques ou une partie d'entre eux ; l'électrophorèse en champ pulsé pour l'analyse du caryotype, la PCR/RFLP des régions NTS2 et ITS du rDNA, le séquençage des domaines D1/D2 du rDNA et, pour l'identification au niveau de la souche, la PCR des régions inter-5 et la RFLP de l'ADN mitochondrial (Pulvirenti et al., 2003).

1.6. Les applications des levures :

Les levures jouent un rôle important dans les chaînes alimentaires, et les cycles de carbone, d'azote et le soufre.

Elle peuvent être génétiquement manipulées par l'utilisation de la technologie recombinante (hybridation, mutation, cytoduction, fusion sphéroplaste, transfert chromosomique unique..) par exemple : *Saccharomyces cerevisiae* , *Hansenula polymorpha* , *Pichia pastoris* sont maintenant utilisés pour exprimer gènes pour produire des protéines humaines d'intérêt pharmaceutique (domaine biotechnologique) (Satyanarayana et Kunze, 2009), et l'utilisation des levures comme agents probiotiques: micro-organismes probiotiques sous forme de suppléments ou aliments fermentés ou levure constituant comme ingrédients alimentaires fonctionnels (Vieira et al., 2015) qui entrants dans le domaine d'industrie des aliments fonctionnels .

Et plusieurs autres utilisations dans plusieurs domaines tels que le domaine agricole ou agro-industriel, Industrie-alimentaire, Agro-alimentaire et le domaine d'alimentation du produit laitier.

Chapitre 2

2. LES PRODUITS LAITIERS FERMENTES

2.1. Le lait :

Le lait est le produit qui est secrété par la glande mammaire des mammifères femelles. Son rôle est de nourrir et de fournir une protection immunologique. Il est produit par les vaches, les buffles, les moutons, les chèvres et les chameaux pour la consommation humaine (Robinson, 2002). Le lait est un liquide biologique complexe et leur principaux composants sont : les protéines (la caséine et les protéines solubles), le lactose, les graisses et les minéraux et des sels de calciums, de phosphore, de chlore, de sodium de potassium et de soufre. Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne, de ce fait on trouve que le lait comporte une flore originelle et une flore de contamination (Bordjah, 2011).

Le lait à l'état naturel est une matière hautement périssable parce qu'il est sensible à la détérioration rapide par l'action des enzymes et des microorganismes (contaminants ou flore naturelle). De nombreux processus ont été développés au fil des ans pour préserver le lait pendant de longues périodes et améliorer son utilisation et sa sécurité par la conversion en une grande variété de produits laitiers, tels que les fromages, les yogourts, le beurre ...etc (Maoloni et al., 2020).

2.2. La microbiologie du lait :

2.2.1. Microflore du lait :

La flore microbienne «totale» quantifiée lors des analyses du lait représente une image non exhaustive de l'ensemble des micro-organismes vivants présents dans l'échantillon du lait. Il est fréquent de classer les micro-organismes en fonction de leur intérêt/risque vis-à-vis de l'élaboration, l'altération et l'hygiène des produits. Parmi les grands types de flores microbiennes habituellement dénombrés dans les laits crus sont les staphylocoques et les coliformes sont systématiquement mis en évidence, à des niveaux moyens similaires quelles que soient les espèces animales laitières. Les bactéries lactiques sont toujours représentées, mais sont plus nombreuses dans les laits de chèvres et de brebis. Dans la plupart des cas pour les laits de vaches, des *Pseudomonas* sont également détectés, ainsi que des bactéries propioniques, des levures et des entérobactéries (Laithier, 2011). La microflore dans le lait lorsqu'il quitte la ferme est influencée de manière significative par la température de stockage et le temps écoulé après la collecte (Robinson, 2002).

2.2.2. La flore de contamination

Le lait peut contenir d'autres micro-organismes dans le cas où il est issu d'un animal malade. Les principales sources de contamination sont les suivantes: (1) Les fèces et téguments de l'animal qui peuvent contenir (*Les Coliformes, Les Bacillus, Les Clostridium et Salmonella*). (2) Sol : peut contenir les bactéries sporulées et les spores de champignons. (3) Les aliments laitiers peuvent être à l'origine de la contamination par les Lactobacilles et *Clostridium butyrique*. (4) Air et eau. (5) Equipement de traite et de stockage du lait : il contient la flore lactique, les microcoques, les lactobacilles et les levures. (6) Le manipulateur : peut être à l'origine de la contamination par les mains (staphylocoques) (Mechrok et al., 2005).

2.2.3. La flore d'altération :

La qualité microbiologique initiale du lait peut varier énormément et il existe trois sources de base de contamination microbienne du lait: (1) de l'intérieur du pis, (2) de l'extérieur des tétines et pis et (3) de l'équipement de manutention et de stockage du lait. Les nombres et les types de micro-organismes dans le lait immédiatement après production (la microflore initiale) reflètent directement la contamination microbienne. Le dénombrement de la flore totale est un indicateur utile pour surveiller la qualité du lait et les conditions sanitaires présentes pendant la production, la collecte et la manipulation (Robinson, 2002).

Les traitements thermiques doux sont couramment appliqués pour réduire les contaminants naturels du lait cru avant consommation ou transformation. Les échantillons de lait cru avaient un nombre total moyen de bactéries; la plupart de ces bactéries étaient des bactéries d'acide lactique (LAB) comme *entérocoques* , *Lactocoques* , *Leuconostocs* , *Lactobacilles mésophiles* , *Entérocooccus. faecalis*, *Enterococcus. faecium* ,*Enterococcus durans*, *Lactococcus. lactis*, *Lactobacillus. plantarum*, *Leuconostoc. lactis* et autre bactéries comme les *Pseudomonas* (Samelis et al., 2009).

2.2.4. La flore pathogène :

a) Les bactéries pathogènes de lait et leurs pathogénies :

La plupart de ces bactéries peuvent provoquer des troubles passagers tels que des diarrhées et des vomissements. C'est le cas de la plupart des *E. coil*, *Campylobacter*, *S. aureus*, *Salmonella*, ou *B. cereus* (Cerf, 2002).

Cependant, d'autres peuvent être à l'origine de maladies graves. Ainsi, on sait que *E. coli* peut provoquer le syndrome hémolytique urémique, surtout chez les enfants de moins de 15 ans, avec une létalité de l'ordre de 1 et 2 % (Haeghebaert et al., 2002). De même, *L. monocytogenes* peut provoquer des avortements tardifs, des septicémies et des troubles nerveux graves aboutissant à la mort dans 20 et 30 % des cas (ces maladies affectent surtout les femmes enceintes, les nouveau-nés, les personnes âgées, les personnes immunodéprimées) (Anonymous, 2001b).

C'est cette létalité élevée qui place *L. monocytogenes* au premier rang des préoccupations des responsables de la santé publique, en matière de toxi-infections alimentaires. Les infections par *Campylobacter* (Federighi, 1999) et certaines souches d'*E. coli* productrices de verotoxine peuvent avoir à long terme des séquelles entraînant des troubles du système nerveux.

b) Le traitement :

Le traitement thermique du lait et la viabilité des germes pathogènes et l'activité de leurs toxines :

Le chauffage du lait aux températures connues de pasteurisation était généralement considéré jusqu'à présent comme suffisant pour détruire avec certitude les germes pathogènes non sporulant qui s'y trouvaient éventuellement. Dans les, derniers temps toutefois, différentes publications ont paru, dans lesquelles il est relaté que l'on aurait décelé également la présence de germes pathogènes dans le lait pasteurisé. Il s'en est suivi que, tant parmi les professionnels que parmi les consommateurs de lait, la question de l'efficacité de la pasteurisation du lait s'est de nouveau posée, tant en ce qui concerne les températures que la durée de chauffage (Kastli, 1957).

C'est ainsi, par exemple, qu'en Allemagne, lors de différentes recherches effectuées sur du lait pasteurisé en bouteilles, on a constaté la présence, en pourcentage vraiment élevé, de bacilles de la tuberculose encore virulents. Par ailleurs, différents auteurs ont examiné la question de la viabilité des rickettsies aux températures de pasteurisation, ils sont arrivés à des résultats partiellement contradictoires. Même la question de la viabilité des virus après pasteurisation mériterait un nouvel examen. En corrélation avec la question de l'action de la chaleur sur les germes pathogènes du lait, on allègue parfois que le chauffage rend bien inactifs les germes vivants, mais ne détruit pas leur toxicité, de sorte que ce mode de

traitement du lait ne pourrait empêcher de porter préjudice à la santé du consommateur (Kastli, 1957).

Une réponse à ces questions ne saurait en aucun cas être fondée sur la notion de la « pasteurisation du lait » vu que les prescriptions légales concernant le degré de température et la durée du chauffage lors de la pasteurisation varient dans les différents pays. Nous ne pouvons non plus partir de la question de savoir si l'on a trouvé encore des germes pathogènes virulents dans du lait " pasteurisé " puisqu'il n'est pas démontré que, de ce chef, le lait mis sur le marché comme étant pasteurisé a été chauffé correctement suivant les prescriptions en vigueur, que toute possibilité de réinfection par des germes pathogènes après pasteurisation a été éliminée, ou qu'un mélange avec du lait cru n'ait pas eu lieu. Ce n'est pas la désignation du lait, mais le résultat du contrôle de la pasteurisation, qui doit fournir la preuve que la pasteurisation a été faite adéquatement. (Kastli, 1957)

2.3. Produits laitiers fermentés :

La fermentation est l'une des premières méthodes connues et utilisée par l'homme dans la transformation et la conservation du lait. Il s'agit d'un processus métabolique microbien (levure ou bactérie) qui convertit le sucre (lactose) en acide organique (acide lactique), alcool et dioxyde de carbone, sous condition anaérobie (Kyung et Orger, 2016). Les métabolites qui en résultent préservent l'aliment et sont à l'origine de l'amélioration de la saveur, de la valeur nutritive, et des propriétés organoleptiques des produits transformés (Caplice et Fitzgerald, 1999). Le lait se prête à de très nombreuses transformations et donne la naissance à des produits laitiers qui sont au cœur de notre alimentation : laits, fromages, yaourts, beurres, crèmes, desserts lactés et autres produits laitiers font ainsi partie de notre quotidien et contribuent, sous des formes variées et riches en goût, à l'équilibre alimentaire à chaque âge de la vie (Kyung et Orger, 2016).

2.3.1. Le lait fermenté :

L'histoire des laits fermentés est étroitement liée à la consommation du lait et à sa conservation. L'histoire de la fermentation du lait remonte aux Sumériens, aux Babyloniens, (Tamime, 2002). La production du lait fermenté est obtenue par la transformation du lactose du lait en acide lactique par fermentation spontanée ou en utilisant des cultures starters obtenues à partir de fabrications antérieures ou par inoculation directe de souches microbiennes sélectionnées. Les microorganismes impliqués dans les modifications

biochimiques du lait comprennent les bactéries lactiques ou une combinaison de bactéries lactiques et les levures (Aryana et Olson, 2017 ; Cardinali et al., 2016-2017). Les bactéries lactique produits des exopolysaccharides, ce qui améliore les propriétés rhéologiques du lait fermenté et améliorer les avantages pour la santé des consommateurs (les troubles fonctionnels intestinaux et le système immunitaire). (Bourlioux et al., 2011).

2.3.2. Le yaourt :

Le yaourt est le plus connu des produits laitiers, est un produit obtenue grâce à l'action de bactéries lactiques, notamment *Streptococcus thermophilus* et d'autres bactéries appartenant très majoritairement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* .

La variété des souches bactériennes utilisées et des ingrédients ajoutés (sucre, fruits) aboutit à un grand nombre de produits qui se caractérisent par une densité énergétique modérée et une teneur élevée en calcium qui les rend difficilement contournables pour atteindre un équilibre alimentaire satisfaisant. Les yaourts sont dotés de fonctionnalités bénéfiques pour la santé, liées aux souches bactériennes spécifiques qu'ils contiennent. (favorisent la digestion du lactose (Bourlioux et al., 2011).

2.3.3. Le fromage :

Le fromage est un des premiers moyens de conservation du lait. C'est un produit laitier « vivant » qui offre une stabilité relative et variable (Richonnet, 2015), et peuvent être préparés à partir de lait cru ou pasteurisé. Les fromages traditionnels, présentent une grande diversité de caractéristiques sensorielles qui résultent principalement de l'évolution et du métabolisme de consortiums microbiens complexes dans le noyau de fromage et/ou à la surface pendant la fermentation et la maturation (Beresford et al., 2001 ; Callon et al., 2004 ; Duthoit et al., 2005).

2.3.4. Le beurre :

Le beurre est une émulsion d'eau dans l'huile, où la matière grasse laitière forme la phase continue. Cela contraste avec la crème, qui est une émulsion de globules gras en suspension dans le lait en phase aqueuse. Ainsi, une inversion de phase en émulsion se produit lors de la fabrication du beurre. Cela se produit lors du barattage de la crème et, par conséquent, la matière grasse laitière est concentrée dans le produit. Le beurre contient 80% de matières grasses laitières (généralement 80 à 81%), 17% d'humidité, 1% de glucides et de

protéines, et 1,2 à 1,5% de chlorure de sodium (sans sel, la matière grasse laitière augmente à 82–83%). Le pH du beurre à la crème sucrée (non fermenté) est d'environ 6,4 à 6,5 (Dvor et al., 2016 ; Çakmakç et al., 2014).

Le goût et l'arôme du beurre dépend fortement des micro-organismes qui résident et fermentent la crème (Caplice et Fitzgerald, 1999).

Chapitre 3

3. LES LEVURES COMMES AGENTS DE BIOCONTROLE ET DE BIOCONSERVATION

3.1. Introduction :

Les levures sont un groupe de micro-organismes caractérisés par la capacité de croître et de survivre dans des conditions différentes et stressantes, puis de coloniser l'écosystème environnemental et humain. Les caractéristiques concurrentielles ont attiré l'attention des scientifiques, qui ont proposé leur application réussie en tant qu'agents bioprotecteurs dans les secteurs agricole, alimentaire et médical...etc. Ces activités antagonistes reposent sur la concurrence pour les nutriments, la production et la tolérance des fortes concentrations d'éthanol, ainsi que sur la synthèse d'une grande classe de composés antimicrobiens, connus sous le nom de toxines tueuses, ont une grande biodiversité, en termes de caractéristiques moléculaires, de déterminants génétiques, de spectres d'action et de mécanismes d'action contre les toxines et contre les mécanismes de détérioration des aliments, mais aussi contre les pathogènes végétaux, animaux et humains (Muccilli et Restuccia, 2015).

3.2. Application des levures dans la bioconservation ou dans le biocontrôle :

Les agents de conservation chimiques des aliments sont couramment utilisés pour prolonger la durée de conservation et pour améliorer la qualité des aliments en inhibant la croissance des bactéries pathogènes. Cependant, les craintes croissantes des consommateurs au sujet de leur toxicité potentielle et des agents pathogènes résistants aux antimicrobiens présents dans les aliments, qui constituent un risque direct pour la santé publique, ont incité la recherche sur des méthodes alternatives et plus sûres de conservation des aliments, dont la biopréservation a été perçue comme un substitut potentiel (Ross et al., 2002 ; Carcho et al., 2015).

Les agents de biocontrôle microbien se sont des agents qui inhibent l'établissement et la croissance des agents pathogènes et l'activité à l'utilisation de fongicides synthétiques (Droby et al., 2009 ; Pertot et al., 2017). La biopréservation ou le biocontrôle désigne l'utilisation de micro-organismes naturels ou contrôlés, ou leurs produits antimicrobiens, pour prolonger la durée de conservation et pour améliorer la sécurité des aliments (Stiles, 1996), et il peut être réalisé par l'ajout de métabolites antimicrobiens sans la souche productrice sans impacter la qualité des aliments ou leur mécanisme de la technologie, seules ou associées à d'autres

moyens de protection des plantes. Ces techniques sont fondées sur les mécanismes et les interactions qui régissent les relations entre espèces dans le milieu naturel. Ainsi, le principe du biocontrôle repose sur la gestion des équilibres des populations d'agresseurs plutôt que sur leur éradication (Contarino et al., 2019).

Un certain nombre de micro-organismes et d'autres agents biologiques ont été considérés comme cruciaux dans la biopréservation des aliments, indirectement (en modifiant le pH ou la pression osmotique) ou directement (en produisant des composés toxiques, composants antimicrobiens, enzymes, antibiotiques...etc.)(Muccilli et Restuccia, 2015). Bien que les études et les applications pratiques les plus intensives des antagonismes microbiens se soient concentrées sur les bactéries d'acide lactique (LAB) les levures représentent une excellente alternative comme agent de bioconservation (Galvez et al., 2014).

Les caractéristiques antagonistes de la levure ont été attribuées principalement à : (1) à la concurrence pour les nutriments en particulier dans les fruits (Janisiewicz, 1994 ; Mercier et Wilson, 1994). La levure épuise rapidement le glucose, le fructose ou le saccharose, empêchant la croissance de micro-organismes indésirables, comme déjà largement exploité dans la fermentation des aliments et des boissons par l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Muccilli et Restuccia, 2015) ; (2) changements de pH dans le milieu à la suite de l'échange d'ions couplé à la croissance ou de la production d'acide organique; (3) tolérance des concentrations élevées d'éthanol (Passoth et Schnürer, 2003) ; et (4) la sécrétion et la libération de composés antimicrobiens, comme les toxines tueuses ou les « mycocines » (Suzuki et al., 2001 ; Schmitt et Breinig, 2006).

3.3. L'activité anti microbienne et anti fongique des levures :

3.3.1. Définition sur les levures à toxine :

Les toxines tueuses à levures, également appelées mycocines ou toxine killer, ont été initialement définies comme des protéines extracellulaires, des glycoprotéines ou des glycolipides qui perturbent la fonction de membrane et cellulaire de la levure sensible au composé (Golubev, 2006 ; Kulakovskaya et al., 2003 ; Kulakovskaya et al., 2004),

L'activité toxique est dirigée principalement contre la levure est étroitement liée à la souche productrice, qui a un facteur protecteur. Le phénotype tueur est répandu parmi la levure et environ 100 espèces tueuses de levure ont été décrites à ce jour. Ainsi, ils ont un

potentiel en tant qu'antimicrobiens naturels dans les aliments et pour contrôle biologique des pathogènes végétaux, ainsi que des agents thérapeutiques contre les animaux et les Infections (Mannazzu et al., 2019).

3.3.2. La Production des toxines :

La production de toxines est un phénotype relativement commun dans la nature. Ceci a été décrit pour les bactéries, levures, et les champignons comme une partie générale d'un mécanisme visant à la domination de la concurrence au sein les niches environnementales dans lesquelles ils vivent (Mannazzu et al., 2019). La production de toxines tueuses a été démontrée parmi de nombreux genres de levure, y compris *Saccharomyces*, avec l'isolement initial d'une souche de *Saccharomyces* qui a inhibé la croissance d'autres souches de *S. cerevisiae*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* et *Zygosaccharomyces* (Young, 2012 ; Muccilli et al., 2013) . La plupart des levures tueuses peuvent tuer d'autres levures de la même ou de différentes espèces et genres (Mannazzu et al., 2019).

3.3.3. Les mécanismes des toxines tueuses :

Les mécanismes bien connus de la toxine tueuse contre d'autres champignons sont l'inhibition de la synthèse ou de l'hydrolyse du glucane dans la paroi cellulaire des souches sensibles, l'interruption de la division cellulaire en bloquant la synthèse de l'ADN, le clivage de l'ARN, le blocage de l'absorption du calcium et la fuite d'ions causée par la formation de canaux sur la membrane cytoplasmique (Ross et al., 2002 ; Carocho et al., 2015). Contrairement à l'antagonisme à levures contre levure/moisissures, les propriétés antibactériennes de la levure sont beaucoup moins documentées.

Matériels et Méthodes

Le présent travail concerne l'isolement et l'étude de l'antagonisme des levures isolées à partir des échantillons de beurre fermenté traditionnel, fabriqué dans la wilaya de Khenchela. Il est communément appelé *Dehan* ou *Smen* dans différentes régions en Algérie.

1. Échantillonnage :

Les échantillons sont récupérés aseptiquement, auprès des commerçants, dans des sacs en plastique stériles, puis conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur traitement.

2. Isolement :

10g de chaque échantillon de *Smen* sont ajoutés à 90 ml d'eau peptonée stérile à 1% (Annexe 1) et homogénéisés. Pendant 45 minutes sur la plaque d'agitation. A partir de cette dilution (10^{-1}), des dilutions décimales sont réalisées de 10^{-2} à 10^{-6} . A partir de ces dilutions, 0,1 ml de chaque dilution est étalé, à l'aide d'un râteau stérile, sur des boîtes de pétri contenant le milieu Sabouraud (Annexe 2), puis les boîtes sont incubées en aérobiose à 30°C pendant 3 à 7 jours (Hammer et al., 1998).

3. Purification et sélection des isolats :

Les colonies, bien individualisées et supposées représentatives des levures, sont aléatoirement sélectionnées. La vérification de la pureté de la souche s'effectue par plusieurs repiquages en milieu solide. Après l'incubation, l'observation des caractères cultureux permet de désigner la pureté des souches. L'examen microscopique est réalisé à partir des colonies suspectes isolées sur milieu de culture précédent (Bouzagag, 2007).

4. Conservations des levures :

Les échantillons des levures sont repiqués sur milieu gélosé (Sabouraud ou Malt Agar (MA) (Annexe 3). Les cultures sont incubées pendant 3 à 7 jours, pour permettre une croissance maximale, puis les cultures pures sont stockées à 4°C pour favoriser leur viabilité et limiter les possibilités de variations (Ul-Haq et al., 2002).

5. Identification :

L'identification des levures isolées, selon les méthodes conventionnelles, repose sur la détermination de divers caractères cultureux, morphologiques et physiologiques (Kurtzman et al., 2011). En effet, les critères d'identification n'ont pas tous la même importance, ils doivent être utilisés dans un ordre bien déterminé (Bouix et Leveau, 1991).

5.1. Les caractères cultureux (macroscopiques):

Cette étude est effectuée à partir d'ensemencement sur milieux liquides et solides. Les caractères cultureux étudiés sont : la forme, l'aspect, la couleur et la croissance des cultures (Filofteia, 2010) :

- **Aspect en milieu liquide:**

Les souches pures sont ensemencées sur milieu YPG (Yeast Peptone Glucose) liquide et incubées 3 jours à 25°C. Au cours de cette incubation, la présence des levures est traduite par l'apparition d'un trouble, d'un voile, d'un anneau, de dépôt granuleux poussiéreux et la formation de gaz.

- **Aspects en milieu solide:**

Les souches pures sont repiquées sur YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar) (Annexe 4) par la méthode des stries. Les boîtes sont incubées 3 jours à 25°C puis laissées à la lumière et à la température ambiante pour favoriser l'apparition éventuelle de pigment. L'observation des colonies est réalisée afin de décrire leur forme (contour régulier ou irrégulier, convexes ou concaves), leur aspect (brillant ou mat, visqueuse) et leur couleuretc.

5.2. Les caractères microscopiques:

- **Forme et taille des cellules:**

L'examen microscopique est effectué pour des cultures jeunes en YPG et YPGA (24- 48 h à 25°C) sur une lame à l'état frais (grossissement x40 et/ou grossissement x100); afin de déterminer la forme, la taille des cellules des levures.

- **Mode de reproduction:**

Pour le mode de reproduction asexuée, une observation sur une lame de l'état frais (grossissement x40 et/ou grossissement x100), est réalisée sur des cultures jeunes en milieu YPGA.

Quant au mode sexuée, les levures sont ensemencées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 5) et Sabouraud et incubées de 7 à 10 jours à 25 °C. Un étalement sur lame est effectué et l'observation au microscope à l'état frais et réalisée (grossissement x40 et/ou grossissement x100).

L'aptitude à la filamentation est observée à partir d'une culture sur milieu PDA en boîte de Pétri. La levure à examiner est ensemencée en une strie longitudinale à la surface du milieu gélosé. Une lamelle stérile est ensuite placée sur le centre de la strie. L'observation microscopique (grossissement x40 et/ou grossissement x100) est réalisée durant le période de 3 à 7 jours. La présence du mycélium et la colonie ainsi que sa nature sont notées (Filofteia, 2010).

5.3. Caractéristiques biochimique et physiologiques:

- **Fermentation des sucres:**

La description standard des levures se base sur la capacité à fermenter certains sucres, examinés dans des tubes de Durham pendant une période fixe. La caractérisation de la fermentation qu'elle soit vigoureuse, bonne, lente ou faible, dépend de la quantité de gaz dégagé dans le tube d'insertion (Kreger-van, 1984).

- **Assimilation de substrats carbonés:**

L'étude de l'assimilation des sources carbonées est réalisée sur milieu minimum YNB (Yeast Nitrogen and carbon Base) (Annexe 6), additionné de 0.5 % de source de carbone: pour 100 ml de l'eau distillé nécessite 6.7 g de YNB et 5g de source carbonés .Ce milieu est stérilisé par filtration (diamètre = 0.22 µm), puis il est réparti dans des tubes contenant 4.5 ml d'eau distillée stérile (0.5 ml/tube). Les substrats carbonés testés sont : le D-glucose, le D-galactose, le saccharose, le D- maltose, le lactose, le raffinose, l'arabinose, le mannitol, rhamnose, sorbitol, D-xylose, amidon soluble, cellubiose, inositol, sorbose. L'assimilation de la source carbonée se traduit par le milieu trouble indiquant la croissance de la souche dans le milieu après incubation à 25°C pendant 72 h à 03 semaines (Temim et Hamaidia, 2018).

Ces composés sont choisis pour leur intérêt distinctif, bien que la connaissance détaillée de leur utilisation, du point de vue biochimique, fait souvent défaut (Ostergaard et al., 2000).

- **Assimilation de substrats azotés :**

La plupart des levures sont capables d'assimiler différentes sources d'azote organiques et inorganiques dans la biosynthèse des acides aminés, des protéines, des acides nucléiques et des vitamines (Guiraud, 1998). L'assimilation des ions d'ammonium (fournis dans le milieu ou dérivés du catabolisme d'autres composés azotés) est largement répandue chez les levures. Cependant, d'autres espèces levuriennes se caractérisent par une capacité à utiliser les nitrates et d'autres composés, comme source d'azote (Walker et al., 1997).

Les sources azotées testées sont : nitrate de potassium (KNO_3), cystéine, tryptophane, leucine, acide aspartique, alanine, thréonine, acide glutamique, glutamine, guanine et adénine, et le sulfate d'ammonium et peptone sont utilisées comme témoin positif. Le milieu utilisé dans cette étude est YCB (Yeast Carbon Base) (Annexe 7), la préparation des solutions azotées : solution acide aminé à 1% et 1g de source azotée dans 100 ml d'eau distillée puis ensemençer dans le milieu de base YCB (stérile) en masse avec 1 ml de levure et bien mélangé. Après solidification du milieu, les disques stériles sont déposés en imprégnés des solutions azotées susmentionnée Incuber 3 à 7 Jour à 25°C. Observer la croissance de la levure autour du composé azoté (Temim et Hamaidia, 2018).

6. Détermination de l'activité antifongique des levures :

Les activités antagonistes des levures sélectionnées sont recherchées contre des moisissures impliquées dans l'altération des aliments et les cultures (fruits et légumes).

6.1. Préparation des souches test :

Les moisissures test sont cultivées sur l'extrait de malt agar (MA) à 30 °C pendant 5 à 7 jours, mettre dans 10 ml d'eau distillée stérile pour la dissociation des spores, après cette suspension est filtrée sur papier Wattman N°= 100mm et dénombrée par cellule de Malassez (Laref, 2014).

6.2. Détermination de pouvoir d'antagonisme des levures :

Les levures sélectionnées sont ensemencés en une seul strie de 2 cm de longueur sur milieu (MA), puis incubées à 28°C pendant 72h. Une goutte de chaque suspension de spores est ensuite déposée à une distance identique des stries, puis incubées à 30°C. L'activité est évaluée régulièrement autour des levures cultivées en mesurant le diamètre des zones d'inhibition entre la levure et la moisissure testée. Ces zones d'inhibition sont mesurées en mm et comparées aux tests de contrôle (ensemencement de la moisissure test sans la levure) (Chen et al., 2018).

Résultats et Discussion

1. Dénombrement :

Ces travaux visaient d'estimer le nombre et d'évaluer la diversité des levures qui contaminent certains produits laitiers (le beurre) en dilution variées dans le sud d'Algérie et dans la Tunisie.

Les échantillons de beurre traditionnel *smen/dhan* prélevés de 4 régions du sud de l'Algérie ; Ain-Safra, Mograr, Béchar et Saïda, se caractérisent par la présence des levures comme le tableau suivant les présente (Kacem et Karam, 2006).

Tableau 2: Nombre moyen des levures de beurre provenant du lait de chamelle recueillis dans quatre régions du Sahara algérien (Kacem et Karam, 2006).

Groupe microbien	Ain-Safra	Mograr	Béchar	Saïda
Levures (log UFC/g)	3.88 ± 0.19	3.84 ± 0.18	2.98 ± 0.18	2.08 ± 0.18

(Moyenne ± écart type)

Le dénombrement des levures dans le beurre traditionnel de la Tunisie, était de 4.81 log UFC/g. Cette valeur était plus élevée que celle rapportée par Sag diç et ces collaborateurs (2004) dans le beurre turc traditionnel (Samet-Bali, 2008).

La charge notée en levures est la conséquence de l'exposition prolongée de produit à l'air libre pourvu de ce type de micro-organismes aérobies au moment de la conservation. Ainsi la présence des levures dans le beurre peut être lié à leur caractère acidophile et à leur faible sensibilité aux bactéries lactiques antagonistes (Benkerroum et al., 2013).

1.1. Identifications :

L'identification des levures est effectuée à l'aide des caractéristiques phénotypiques et biochimiques. L'examen microscopique des isolats levurienne prélevés des différentes colonies, au grossissement 10x10, laisse apparaître des levures de forme ronde ou ovoïde. Elles se groupent en amas, en chaînette ou en paires sous forme de bourgeonnement.

À partir des données biochimiques et physiologiques présentées, il est évident que tous les espèces de levures qui sont également systématiquement isolés du beurre traditionnel et

identifié pourraient assimiler les sources de carbone D-glucose et inuline (Moubasher et al., 2018 ; Kacem et Karam, 2006). Les principales espèces de levures présentes dans ce beurre traditionnel (*smen/dhan*) appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, et au genres *Saccharomyces*, *candida* et *Pichia* (Moubasher et al., 2018).

2. L'activité antagoniste des levures :

Les levures jouent un rôle important dans la qualité et la sécurité des produits alimentaires (Moubasher et al., 2018), en raison de leur action antagoniste contre les champignons, certaines levures ont été développées comme agents de biocontrôle et de bioconservation des aliments contre les moisissures (Fleet, 2007).

Les levures ont différents mécanismes d'action de leur activité antifongique, soit par (1) l'inhibition de la croissance du mycélium, (2) la production des enzymes qui dégradent les parois cellulaires fongiques, (3) la production des substances volatiles antifongiques, (4) la concurrence pour les substrats, et (5) l'action sur la germination fongique des spores (Nally et al., 2015).

La plupart des levures tueuses sont utilisées comme starter pour empêcher la croissance des levures, moisissures et des bactéries de détérioration dans les fermentations de vin (Hara et al., 1980 ; Cocolin et Comi, 2011). Par exemple dans le cas de la production de vin mousseux, Todd et ces collaborateurs (2000), ont étudié le comportement de deux souches sensibles de *Saccharomyces cerevisiae* en présence d'un mélange de deux toxines tueuses (K2 et Klus) (tableau3), contre les microorganisme de détérioration (Pfeiffer et Radler, 1984 ; Van Vuuren et Jacobs, 1992 ; Maqueda et al., 2012). Aussi, une souche de *Saccharomyces cerevisiae* a été également exploitée dans la production de pain (Bortol et al., 1986).

Les deux toxines tueuses, CpKT1 et CpKT2, de la levure isolée du vin *Candida pyralidae* (tableau3) ont montré une activité mortelle contre plusieurs souches de *Brettanomyces bruxellensis*, en particulier dans le jus de raisin (Mehlomakulu et al., 2014).

Les souches de levure isolées de la canne à sucre et de la rhizosphère de maïs, des feuilles et des tiges, identifiées comme *Torulaspora globosa*, ont inhibé la croissance des moisissures phytopathogènes, *Colletotricum sublineolum* et *Colletotrichum graminicola*, (tableau3), deux agents de l'antracnose dans, respectivement, le sorgho et le maïs (Rosa-Magri a al., 2011).

D'autres résultats des interactions levure/moisissure (Figures 4 et 5), montrent l'effet de la culture combinée des 10 souches de *Saccharomyce Cerevisiae* (S mix) sur la croissance de *Aspergillus Carbonarius*. Il était évident que *Saccharomyces. cerevisia* cultivée soit individuellement ou en culture mixte avec d'autres levures a eu comme conséquence l'inhibition totale d'*Aspergillus. carbonarius*. Les autres espèces de levure (*Rhodotorula. spp*, *Pichia. spp* et *Dekkera. spp*) ont présenté également des activités antagonistes (Tryfinopoulou et al., 2020).

Dans le secteur laitier, l'utilisation de souches de levure starter pour prévenir la détérioration du fromage (Fatichenti et al., 1983 ; Liu et Tsao, 2009 ; Jakobsen et Narvhus, 1996), du yogourt (Lowe et al., 2000 ; Liu et Tsao, 2009 ; Liu et Tsao, 2010) et d'autres aliments comme le beurre (Palpacelli et al., 1991) a également attiré une attention considérable

Tableau 3: Exemples de levure tueuses et mécanismes antagonistes dans les applications d'aliments et de boissons transformés (Muccilli et Restuccia, 2015).

Espèces	Mécanisme	Applications
<i>Candida. pyralidae</i>	non précisé.	Dans le jus de raisin contre <i>Brettanomyces. bruxellensis</i>
<i>Saccharomyces. cerevisiae</i>	K2 et Klus toxines	Dans la vinification contre les souches de levure de détérioration
<i>Torulaspota globosa</i>	Toxine tueuse	sorgho et maïs contre <i>Colletotrichum sublineolum</i> et <i>Colletotrichum graminicola</i>

<p><i>Ustilago maydis</i></p>	<p>La toxine KP6, canal ion, pouvant causer la fuite de K⁺ ou NH₄⁺ des cellules</p>	<p>Dans le jus de raisin contre les souches de <i>Brettanomyces. Bruxellensis</i></p>
<p><i>Williopsis. saturnus</i> var. <i>saturnus</i></p>	<p>Concurrence pour l'espace et la toxine tueuse</p>	<p>Dans le fromage bioconservation contre <i>S. cerevisiae</i> et <i>Kluyveromyces. marxianus</i>. Et dans le yaourt contre <i>Kluyveromyces. marxianus</i>, <i>Saccharomyces. cerevisiae</i>, <i>Saccharomyces. bayanus</i>, <i>Byssochlamys</i>, <i>Eurotium</i> et <i>Penicillium</i></p>
<p><i>Saccaromyces. Cerevisiae</i></p>	<p>Non précisé</p>	<p>Transfert de particules tueuses à la souche industrielle pour l'industrie de la boulangerie</p>

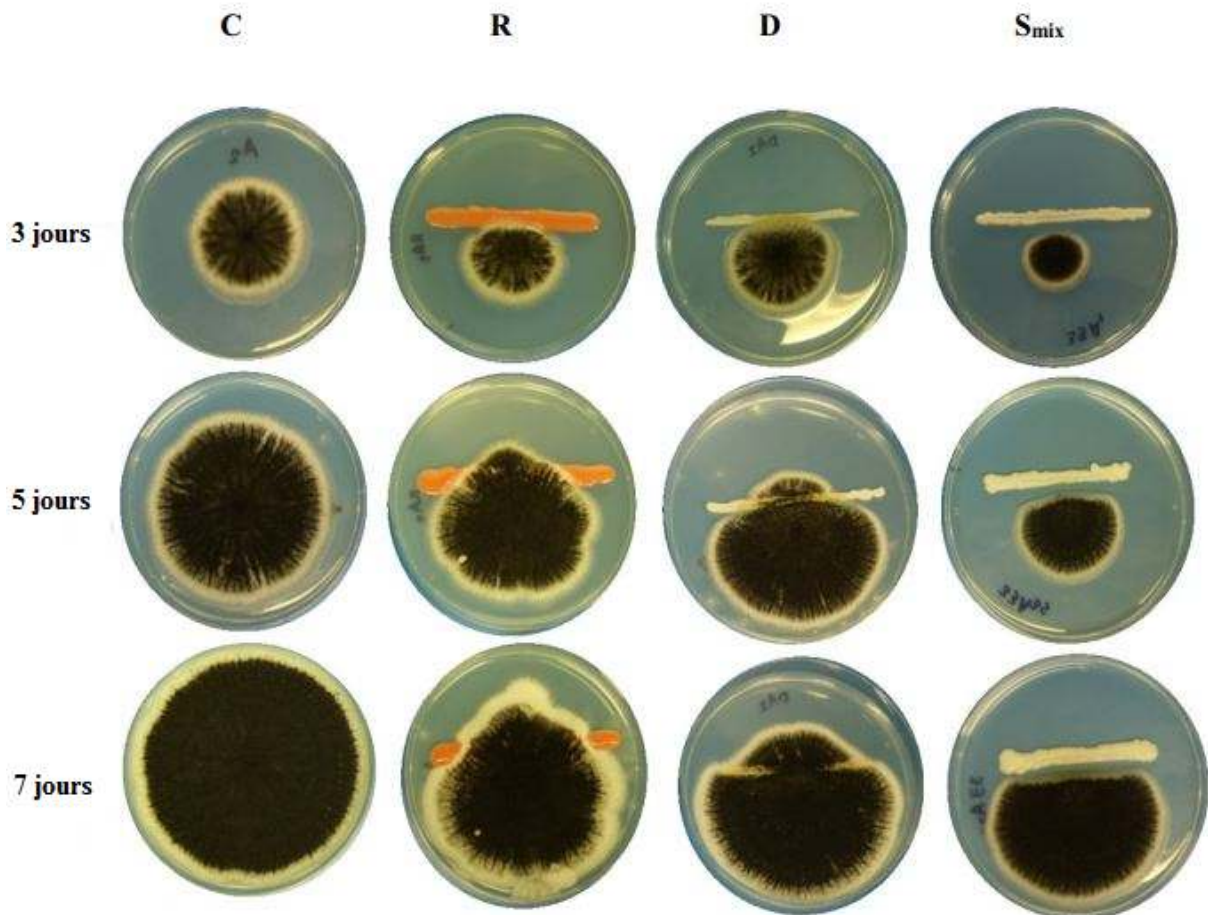


Figure 4: Interaction de levure contre *Aspergillus. carbonarius* pendant le stockage à 25 °C sur MEA (Malt Extract Agar) après 3, 5 et 7 jours. *Aspergillus. carbonarius* (C) avec levures inoculées dans les lignes R: *Rhodotorula. mucilaginosa*, D: *Dekkera. bruxellensis*, et Smix: culture combinée de 10 souches de *Saccharomyces. cerevisiae* (Tryfinopoulou et al., 2020).



Figure 5: *Aspergillus. carbonarius* (C) inoculée sur CYA (Czapek Yeast Agar) à 25 °C pendant 7 jours avec différentes espèces de levure. Pmix: culture combinée de 4 souches de *Pichia. spp*, Smix: culture combinée de 10 souches de *Saccharomyces. cerevisiae*, R: *Rhodotorula. mucilaginosa*, et D: *Dekkera. bruxellensis* (Tryfinopoulou et al., 2020).

3. Conclusion générale :

Les études sur les levures isolées du beurre traditionnel *smen/dhan* et de leurs caractères dévoilent une diversité assez large des espèces différentes. Grâce à ces nombreuses propriétés bénéfiques trop importantes en industrie alimentaire spécialement laitière, les souches levuriennes, acteurs de fermentation ont montré des capacités parmi lesquelles; la capacité d'inhiber la croissance des moisissures d'altération des aliments (activités antagoniste). Ils sont maintenant utilisés comme des agents de biocontrôle des spores fongiques liée à la toxine.

Cette synthèse bibliographique, nous a permis de constater l'importance de la diversité et des activités de la flore levurienne dans les matrices alimentaires, notamment dans les produits laitiers fermentés traditionnels comme le *smen/dhan*. Il serait intéressant de mener d'autres recherches dans le futur afin de :

- identifier les souches levuriennes isolés par les méthodes moléculaires ;
- réaliser des tests in vitro pour la sélection des isolats performants ;
- étudier profondément le pouvoir antagonique, et en caractérisant leurs molécules actives.

Références Bibliographiques

A

- **Abu. E. A., Ado. S. A., James. D. B, (2005).** Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* grown on sorghum pomace. African Journal of Biotechnology. Vol: 4. N°: 8. Pages: 785-790.
- **Ahearn. D.G, (1973).** Estuarine Microbial Ecology: The Belle W. In. Marine Science 1. University of South Carolina Press. Columbia. South Carolina. Pages: 433-440
- **Anonymous, (2001b).** Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods risk characterization of *Salmonella* spp. in eggs and broiler chickens and *Listeria mono- cytogenes* in ready-to-eat foods FAO Headquarters. Rome. Italy.
- **Antonietta Maolonia., Giuseppe Blaiottab., Ilario Ferrocinoc., Nicoletta. P. Mangiad., Andrea Osimania., Vesna Milanovića., Federica Cardinalia., Cristiana Cesaroa., Cristiana Garofaloo., Francesca Clementia., Marina Pasquinia., Maria Federica Trombettaa., Luca Cocolinc., Lucia Aquilantia, (2020).** Microbiological characterization of Gioddu. An Italian fermented milk. International Journal of Food Microbiology. Vol: 323. Pages: 9.
- **Aryana. K. J., Olson. D. W, (2017).** Yogurt and other cultured dairy products. J. Dairy Sci. Vol: 100. Pages: 9987-10013.

B

- **Benkerroum. N, (2013).** Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Foods Safety Challenges With Regard to Microbiological Risks. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol.12. Pages: 54-89.
- **Benkerroum. N., Tamime. A. Y, (2004).** Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (lben, smen, jben) to small industrial scale. Food microbiology. Vol: 21. Pages: 399-314.

- **Bensalah. F., Labtar. A., Delorme. C., Renault. P., (2011).** Occurrence. Isolation and DNA identification of involved in Algerian traditional butter "Smen". African journal of biotechnology.
- **Beresford. T. P., Fitzsimons. N. A., Brennan. N. L., Cogan. T. M., (2001).** Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy J. Vol : 11. Pages: 259-274.
- **Bonaly. R., (1991).** Morphologie et reproduction asexuée des levures Ds : **Larpent J.P.** Biotechnologie des levures. Masson, Milan Barcelone Bonn. Paris. Pages: 4-18.
- **Bordjah Akli, (2011).** Analyse physico-chimique et microbiologie de lait UHT demi-écrémé. Thèse d'obtention de brevet de technicien supérieure. Algérie : centre de formation professionnelle El Hidhab Sétif.
- **Bortol. A., Nudel. C., Fraile, E., de Torres. R., Giulietti. A., Spencer. J. F. T., (1986).** Spencer, D. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol: 24. Pages: 414-416.
- **Bouix. M., Leveau. J. Y., (1991).** Les levures Ds : **Bourgeois. C.M., Leveau. J.Y.,** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Édition. Lavoisier-Tec & Doc. Vol : 21. Pages: 206-229.
- **Bourliouxa Pierre., Braesco Véronique., Mater Denis. D. G., (2011).** Yaourts et autres laits fermentés. Cahiers de nutrition et de diététique. Vol: 46. Pages: 304-318.
- **Bouzegag hamida, (2007).** Recherche et identification des souches de levures types sahariens issus de la datte et du vinaigre traditionnelle de dattes. thèse d'études supérieures en biologie. Ouargla : université Kasdi Mernah.

C

- **Cakmakci. R., Turan. M., Gulluce. M., Sahin. F, (2014).** Rhizobacteria for reduced fertilizer inputs in wheat (*Triticum aestivum* spp. *vulgare*) and barley (*Hordeum vulgare*) on Aridisols in Turkey. *International Journal of Plant Production*. Vol: 8. N°: 2. Pages: 163-182.
- **Callon. C., Millet. L., Montel. M. C, (2004).** Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* Vol: 71. Pages: 231-244.
- **Caplice.E., Fitzgerald.G. F, (1999).** Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Pages: 50-131.
- **Cardinali. F., Taccari. M., Milanović. V., Osimani. A., Polverigiani. S., Garofalo. C., Foligni. R., Mozzon. M., Zitti. S., Raffaelli. N., Clementi. F., Aquilanti. L, (2016).** Yeast and mold dynamics in Caciofiore della Sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All. *Yeast*. Vol: 33. Pages: 403-414.
- **Carocho. M., Morales. P., Ferreira. I.C.F.R, (2015).** Natural food additives: Quo vadis *Trends Food Sci. Technol.* Vol: 45. Pages : 284-295.
- **Cerf Olivier, (2002).** Risques liés aux bactériens produits laitiers. La sécurité sanitaire des aliments d'origine animale. N° 348.
- **Chen. K., Escott. C., Loira. I., Fresno. J. M., Morata. A., Tesfay. W, (2018).** Use of non-*Saccharomyces* yeasts and oenological tannin in red winemaking influence on color, aroma and sensorial properties of young wines. *Food Microbiology*. Vol: 69. Pages: 51-63.
- **Cocolin. L., Comi. G, (2011).** Killer yeasts in winemaking. In *Hand Book of Enology: Principles, Practices and Recent Innovation*. Joshi. V.K. Ed. Asiatech Publishers Inc.: Delhi. India. Pages: 564-590.

- **Contarino Rosaria., Brighina Selina., Fallico Biagio., Cirvilleri Gabriella., Parafati Lucia., Restuccia Cristina, (2019).** Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts .food microbiology. Vol: 82. Pages: 70-74.

D

- **Droby. S., Wisniewski. M., Macarisin. D., Wilson. C, (2009).** Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? Postharvest Biol. Technol. Vol: 52.Pages: 137-145.
- **Duthoit, F., Callon. C., Tessier. L., Montel. M. C, (2005).** Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in “Registered Designation of Origin” Salers cheese. Int. J. Food Microbiol. Vol: 103. Pages: 259-270.
- **DuToit. M., Pretorius. I.S, (2000).** Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature’s own arsenal—A review. S. Afr. J. Enol. Vitic. Vol: 21. Pages: 74-96.
- **Dvor. N., Modi. P., Glavis-Bloom. J., Nasrin. S., Guy. A., Chowa. E. P.,et al, (2016).** Accuracy of Inferior Vena Cava Ultrasound for Predicting Dehydration in Children with Acute Diarrhea in Resource-Limited Settings. Plos. One.

F

- **Fatichenti. F., Bergere. J. L., Deiana. P., Farris. G. A, (1983).** Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium. tyrobutyricum* and *C. butyricum*. J. Dairy Res.Vol: 50. Pages: 449-457.
- **Federighi. M, (1999).** *Campylobacter* et hygiène des aliments, Editions Polytechnique. Paris.
- **Filofteia, (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l’université de bourgogne discipline: sciences de

l'alimentation université de Bourgogne, institut universitaire de la vigne et du vin (institut jules guyot) Vol : 193. Pages : 1-58.

- **Fleet. G. H, (2007).** Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Curr Opin Biotechnol. Vol: 18. Pages: 5-170.

G

- **Galvez. A., Grande Burgos. M. J., López. R. L., Perez Pulido. R, (2014).** Food Biopreservation. Springer-Verlag: New York. NY. USA. Pages: 15-22.
- **Golubev.W.I, (2006).** Antagonistic interactions among yeasts. In Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Rosa. C.A. Peter. G. Eds. Springer-Verlag: Berlin. Germany. Pages: 197-219.
- **Guiraud. J. P, (1998).** Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. Pages: 310-321.

H

- **Haeghebaert. S., Le Querrec. E., Gallay. A., Bouv. P., Gomez. M., Vaillant. V, (2002).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France. Bull. Epidemiol. Hebd.
- **Hammer. E., Krowas. D., Schafer. A., Specht. M., Franche. W., Schauer. F, (1998).** Isolation and Characterization of Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. Appl Environ Microbiol. Vol: 64. Pages: 2215-2219.
- **Hara. S., Iimura. Y., Otsuka. K, (1980).** Breeding of useful killer wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. Vol: 31. Pages: 28-33.

I

- **Ibukun. E .O., Akindumila. F, (1998).** Extracellular amylase production by isolates of Bacilli micro-organism cultured on different starchy food broths. Nig. J. Biochem. Mol. Biol.Vol: 13. Pages: 91-95.

J

- **Jakobsen. M., Narvhus. J, (1996).** Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. Int. Dairy J. Vol: 6.Pages: 755-768.
- **Janisiewicz. W.J, (1994).** Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears. Appl. Environ. Microbiol. Vol: 60. Pages: 2671-2676.

K

- **Kacem Mourad., Karam Nour-Eddine, (2006).** Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Faculté des Sciences, Département de Biotechnologie, Université d’Es Senia BP 1524 Oran El M’Naour (31000) Oran Algérie. Pages: 198-204.
- **Kastli. P, (1957).** L'influence du traitement thermique du lait sur la viabilité des. Germes pathogènes et sur l'activité de leurs toxines.
- **Kreger-Van Rij. N. J, (1984).** The Yeast. A Taxonomic Study. Elsevier Biomedical. Press, Amsterdam.
- **Kulakovskaya. T. V., Shashkov. A. S., Kulakovskaya. E.V., Golubev.W. I, (2004).** Characterization of an antifungal glycolipid secreted by the yeast *Sympodiomyopsis paphiopedili*. FEMS Yeast Res.Vol: 5. Pages: 247-252.

- **Kulakovskaya. T., Kulakovskaya. E., Golubev. W, (2003).** ATP leakage from yeast cells treated by extracellular glycolipids of *Pseudozyma fusiformata*. FEMS Yeast Res. Vol: 3. Pages: 401-404.
- **Kurtzman. C. P., Fell. J.W., Boekhout. T, (2011).** The yeasts .A taxonomic study. 5^{ème} édition. USA. Pages: 537.
- **Kyung Luna., Oger Camille, (2016).** L'art de la fermentation. Éditions La Plage.

L

- **Laithie Cécile, (2011).** Microflore du lait cru. Réseaux fromage de terroirs. Édition Cnol : conseil national des appellations d'origine laitières. France. Pages: 131.
- **Laref.Nora, (2014).** L'étude de l'activité antifongique de lactobacilles et leur effet sur la croissance d'*Aspergillus sp.* Thèse de doctorat de 3^{ème} cycle de LMD. Université d'Oran. Pages: 64-78.
- **Larpent. J.P, (1991).** Biotechnologie des levures. (Ed).Masson. Paris. Pages: 426.
- **Larpent. J.P., Larpent G.M, (1997).** Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} édition. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. Pages: 217- 240.
- **Leclerc. H., Meyer. A., Deiana. J, (1995).** Cours de microbiologie générale. Nouveau programme. Biosciences et Techniques. Doin éditeurs. Paris. Pages: 73-92.
- **Leveau. I.V., Bouix. M, (1993).** Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. Pages: 612.

- **Liu. S.Q., Tsao. M, (2009).** Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. Food Control. Vol: 20 Pages: 852-855.
- **Liu. S.Q., Tsao. M, (2009).** Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. Int. J. Food Microbiol. Vol: 135. Pages: 34-38.
- **Liu. S.Q., Tsao. M, (2010).** Biocontrol of spoilage yeasts and moulds by *Williopsis saturnus* var. *saturnus* in yoghurt. Nutr. Food Sci. Vol: 40. Pages: 166-175.
- **Lowes. K. F., Shearma. C. A., Payne. J., MacKenzie. D., Archer. D. B., Merry. R. J., Gasson. M. J, (2000).** Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. Appl. Environ. Microbiol. Vol: 66. Pages: 1066-1076.

M

- **Madigan. M., Martinko. J, (2007).** Brock-Biologie des micro-organismes. 11ème édition. Pearson Education.France. Pages : 1047.
- **Maïworéa Justine., Tatsadjieu Ngoune Leopold., Piro-Metayer Isabelle., Didier Montet, (2019).** Identification of yeasts present in artisanal yoghurt and traditionally fermented milks consumed in the northern part of Camero. African journal of science.
- **Mannazzu Ilaria , Domizio Paola , Carboni Gavino, Zara Severino, Zara Giacomo, Comitini Francesca, Budroni Marilena and Ciani Maurizio, (2019).** Yeast killer toxins: from ecological significance to application. Critical Reviews in Biotechnology, <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679> . Pages: 15.
- **Manyri L, (2005).** Analyse automatique d'image de population microbienne. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- **Maqueda. M., Zamora. E., Álvarez. M.L, (2012).** Ramírez, M. Characterization, ecological distribution, and population dynamics of *Saccharomyces sensu stricto* killer

yeasts in the spontaneous grape must fermentations of southwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol: 78. Pages: 735-743.

- **McNeill. J., F.R. Barrie., H.M. Burdet., V. Demoulin., D.L.Hawksworth., K. Marhold, D.H. Nicolson., J. Prado., P.C. Silva., J.E. Skog., J.H. Wiersema., N.J. Turland, (2006).** (Eds). *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code)*. A.R.G. Gantner Verlag KG. Ruggell. Liechtenstein. <http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm> .

- **Mechrouk. S., Mahmoudi. M., Aid. A, (2005).** *Controle Microbiologique de lait cru, Lben ,Raib et Yaourt de laitiers El Hodna Lait /M'sila*. Thèse de master.M'Sila. Université Mohamed Boudiaf de M'Sila.

- **Mehlomakulu. N. N., Setati. M. E., Divol. B, (2014).** *Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-Saccharomyces yeasts and their action on Brettanomyces spp.* *Int. J. Food Microbiol.* Vol: 188. Pages: 83-91.

- **Mercier. J., Wilson. C. L, (1994).** *Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced Candida oleophila and their effect on infection by Botrytis cinerea during storage.* *Biol. Control.* Vol: 4. Pages: 138-144.

- **Moubasher. A. A. H., Abdel Sater. M. A., Soliman. Z. S. M, (2018).** *Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt.* *Journal de Mycologie Médicale.* Vol: 28. Pages: 76-86.

- **Muccilli Serena., Restuccia Cristina, (2015).** *Bioprotective Role of Yeasts, microorganism's* www.mdpi.com/journal/microorganisms . Vol: 3.Pages: 588-611.

- **Muccilli. S., Wemhoff. S., Restuccia. C., Meinhardt. F, (2013).** *Exoglucanase-encoding genes from three Wickerhamomyces anomalus killer strains isolated from olive brine.* *Yeast* .Vol: 30.Pages: 33-43.

N

- **Nally. M.C., Pesce. V. M., Maturano. Y. P., Rodriquez Assaf. L. A., Toro. M. E., Castellanos de Figueroa. L. I., Vazquez. F, (2015).** Antifungal models of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.024>. Vol: 204. Pages: 91-100.

O

- **Oliveira Faria., Fabio., Puga Sonia., Ferreir Celia, (2013).** « Yeast: World's Finest Chef ». In *Food Industry*.
- **Ostergaard. S., Olsson. L., Nielsen. J, (2000).** Metabolic engineering of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol. Rev.* Vol : 64. N°: 1. Pages 34-50.
- **Oteng-Gyang. K, (1984).** Introduction à la microbiologie dans les pays chauds. (Ed). Lavoisier. Paris. Pages: 43-46.

P

- **Palpacelli. V., Ciani. M., Rosini. G, (1991).** Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiol. Lett.* Vol: 84. Pages: 75-78.
- **Passoth. V., Schnürer. J, (2003).** Non-conventional yeasts in antifungal application. In *Functional Genetics of Industrial Yeasts*; de Winde. H. Ed. Springer-Verlag: Berlin. Germany. Vol: 2. Pages: 297-330.
- **Pertot. I., Giovannini. O., Benanchi. M. Ca. T., Rossi. V., Mugnai. L, (2017).** Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine. *Crop Prot.* Vol: 97. Pages: 85-93.

- **Pfeiffer. P., Radler. F, (1984).** Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K2. Arch. Microbiol. Vol: 137. Pages: 357-361.
- **Pulvirenti. A, (2003).** Identification of yeasts by molecular techniques. Vol: 76. Pages: 635-649.

R

- **Richard. K. Robinson, (2002).** Dairy microbiology handbook .The microbiology of milk and milk products. Third edition. Canada. Pages: 725-765.
- **Richonnet Céline, (2015).** Caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus. Nutritional properties of processed cheeses. Cahiers de nutrition et de diététique.(2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.cnd.2015.12.001> .Pages: 9.
- **Rosa-Magri. M. M., Tauk-Tornisielo. S. M., Ceccato-Antonini. S. R, (2011).** Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. Braz. Arch. Biol. Technol. Vol: 54. Pages: 1-5.
- **Ross. R.P., Morgan. S., Hill. C, (2002).** Preservation and fermentation: Past, present and future. Int. J. Food Microbiol. Vol: 79. Pages: 3-16.

S

- **Sag̃diç. O., Dõnmez. M., Demirci. M, (2004).** Comparison of characteristics and fatty acid profiles of traditional Turkish yayik butters produced from goats. Ewes. Or cows. Milk. Food Control. Vol: 15. Pages: 485-490.
- **Samelis John., Lianou Alexandra., Kakouri Athanasia., Delbe`S C`eline., Rogelj Irena., Bogovic Bojana -Matijas`ic´., Montel Marie-Christine, (2009).** Changes in the Microbial Composition of Raw Milk Induced byThermization Treatments Applied Prior to Traditional Greek Hard Cheese Processing. Journal of Food Protection. Vol: 72 .Nº: 4. Pages: 783-790.

- **Samet Bali. O., Ayadi. M. A., Attia. H, (2009).** Traditional Tunisian butter: Physicochemical and microbial characteristics and storage stability of the oil fraction. LWT - Food Science and Technology journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt . Vol: 42. Pages: 899-905.
- **Satyanarayana. T., Kunze Gotthard, (2009).**Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Ed.india and Germany. Pages: 744.
- **Schmitt. M. J., Breinig. F, (2006).** Yeast viral killer toxins: Lethality and self-protection. Nat. Rev. Microbiol. Vol: 4. Pages: 212-221.
- **Scriban. R, (1984).** Biotechnologies. 2èmeédition. Techniques et Documentation-Lavoisier. Paris. Pages: 531.
- **Simon. P., Meunier. R, (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson., Cie. Paris.
- **Sperber. W. H., Doyle. M. P, (2009).** Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Springer: New York. NY. USA.
- **Stiles. M. E, (1996).** Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwen. Vol: 70. Pages: 331-345.
- **Suzuki. C., Ando. Y., Machida. S, (2001).** Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. Yeast .Vol: 18. Pages: 1471-1478.

T

- **Tamaki. N., Hama. T, (1982).** In: Methods in Enzymology.(Wood W.A.,ed.),Academic. Press, London. Pages: 285-306.
- **Tamime. A.Y, (2002).** Microbiology of starter cultures. In: Dairy microbiology handbook (Robinson. R. K.).3ème edition. John Wiley and Sons. Inc. New York .Pages: 261-366.

- **Temim Maroua., Hamaidia Nesrine, (2018).** Screening et identification des levures pour la mise en évidence des enzymes. Thèse de Master. Constantine: Université des Frères Mentouri.
- **Todd. B. E., Fleet. G. H., Henschke. P. A, (2000).** Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. Am. J. Enol. Vitic. Vol: 51. Pages: 65-72.
- **Tryfinopoulou Paschalitsa., Chourdaki Antonia., Nychas George-John. E., Panagou Efstathios. Z, (2020).** Competitive yeast action against *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production. International Journal of Food Microbiology journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro. Vol: 317. pages: 9.

U

- **Ul-haq. I., Roheena. A., Ashraf. H., Shah. A. H, (2002).** Isolation and Screening of Fungi for the Biosynthesis of Alpha Amylase. Biotechnology. Vol: 1. N° (2-4). Pages: 61-66.

V

- **Van Uden. N., Fell. J.W, (1968).** Advances in Microbiology of the Sea. Academic. Press. New York. Vol: 1. Pages: 167-201.
- **Van Vuuren. H. J. J., Jacobs. C. J, (1992).** Killer yeasts in the wine industry: A review. Am. J. Enol. Vitic. Vol: 43. Pages: 119-128.
- **Vieira. C., álvares. T., gomes. L., et al, (2015).** Kefir Grains Change Fatty Acid Profile of Milk during Fermentation and Storage. Plos One. J. Grèce. Vol: 10. Pages: 11-13.

- **Vishniac. H. S., Hempfling. W. P, (1979).** Journal of General Microbiology .Pages: 112-301.

W

- **Walker. G. M., Wiley. J., Chihhster. S, (1997).** Yeast Physiology and Biotechnology.
- **Walker. G., McLeod. A. H., Hodgson. V. J, (1995).** Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. FEMS Microbiology Letters Vol: 127. Pages: 213-222.

Y

- **Young. T.W, (2012).** Killer yeasts. In The Yeasts. 2nd ed. Rose. A.H. Harrison. J.S. Eds. Academic Press: London. UK. Vol: 2. Pages: 131-164.

Annexes

Annexe 1 :**L'eau péptonée :**

Peptone.....5 g

Eau distillée.....1000 ml

Annexe 2 :**Sabouraud :**

Glucose.....20 g

Peptone.....10 g

Agar.....15 g

Eau distillée.....1000 ml

Annexe 3 :**Malt Agar (MA) ou Malt extrait Agar (MEA) :**

Extrait de malt30 g

Peptone.....5 g

Glucose.....15 g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000 ml

Annexe 4 :**Yeast Peptone Glucose Agar (YPGA) :**

Extrait de levure10g/L

Glycérol.....20ml/L

Peptone.....20g/L

Agar (pour le milieu solide).....20g/L

Annexe 5:**✚ Potato Dextrose Agar (PDA):**

Extrait de pomme de terre

Glucose.....20 g

Agar.....20 g

Eau distillée.....1000 ml

Annexe 6 :**✚ Yeast Nitrogen and carbon Base (YNB) :**

Nitrogen..... 6,7g

Eau distillée..... 100mL

Glucose..... 5g

Annexe 7:**✚ Yeast Carbon Base (YCB):**

Carbone.....11,7g

Eau distillée..... 100mL

Annexe 8 :**✚ Czapek Yeast Agar (CYA):**

Czapek + extrait de levures

Milieu CZ..... 1 litre

extrait de levures..... 5,0 g

✚ NB : Milieu CZ :NaNO₃..... 3,0 gMgSO₄ 7H₂O..... 0,5 g

KCl0,5 g

FeSO₄ 7H₂O0,01 gK₂HPO₄.....4 1,0 g

Saccharose..... 30,0 g

Agar..... 15,0 g

Il est conseillé de compléter ce milieu par 1 ml d'une solution de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g dans 100 ml d'eau.