



Mémoire MASTER ACADEMIQUE / PROFESSIONNEL

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

HAFIDI Nada

BOUROUBA Bouthaina

ATIL Abdeljallil

Thème

*Recherche et criblage de bactéries lactiques et de levures
d'intérêt technologique isolées à partir de levain
traditionnel*

Devant le jury :

Présidente:	Dr. DEROUICHE Faouzia	MCA	Université de Khenchela
Encadrante :	Dr. MERABTI Ryma	MCA	Université de Khenchela
Examinatrice :	Dr. SEBIHI Fatima	MCA	Université de Khenchela

Soutenu le : **27 /06/2022**

Année 2021/2022

Remerciements

On remercie, Dieu, le tout puissant de nous avoir donné la foi qui nous a guidé jusqu'à la réalisation et l'aboutissement de ce travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

On voudrait exprimer nos remerciements les plus vifs à

Dr.DEROUCHE Faouzia.

Qui a accepté de présider ce jury.

Nos sincères remerciements vont à

Dr.SEBIHI Fatima

d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier particulièrement notre encadrante

Dr.MERABTI. Ryma

d'avoir proposé et dirigé ce sujet passionnant. Pour son aide, ses conseils, et orientations tout au long de notre travail malgré ses multiples occupations.

Merci pour votre patience et votre générosité. Que Dieu vous récompense.

On voudrait exprimer nos remerciements les plus vifs à

Dr. LEULMI. Nassima.

Pour son aide, et ces précieux conseils. On ne peut sincèrement vous exprimer nos respects et notre gratitude.

On souhaite également remercier l'ensemble du personnel travaillant aux laboratoires pédagogique de l'université Abbes Laghrour Khenchela et particulièrement

Mme CHORFI Rafika et Mme MIZAN Sara,

Ainsi que le personnel du département BMC et de la bibliothèque de la biologie qui ont contribué pour mener à bien ce travail.

Nos remerciements vont également à nos enseignants qui nous ont accompagnés pendant notre cursus universitaire.

Enfin, on

adresse nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

*Tout au début, je tiens à remercier le bon Dieu de m'avoir
donné du courage et de la patience afin de réaliser ce modeste travail que
je dédie à :*

Mes très chères parents qui m'ont beaucoup soutenu et

Encouragé jusqu'au bout

Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

*Ma vie entière serait insuffisante pour vous exprimer ma profonde
gratitude.*

A ma chère grand- mère le symbole de tendresse.

*A mes chères sœurs, pour leurs encouragements et pour leurs
aide. Que Dieu vous bénisse et vous protège.*

*Ma grande famille, mes oncles, tantes, paternels et maternels, mes
cousins et cousines.*

*A ma camarade et ami Bouthaina que dieu vous donne la santé, le
bonheur, le courage et surtout la réussite.*

*A tous mes professeurs qui m'ont accompagné tout au long de mon
parcours académique.*

Enfin à tous ceux qui aiment la science et la recherche.

H.Nada

Dédicaces

Je tiens avec grand plaisir de dédier ce modeste travail :

A l'être le plus chère de ma vie source d'amour et d'affection

«Ma mère »

*A mon père, qui a quitté ce monde mais qui reste toujours ma
source de motivation, de force et de détermination,*

*A mes chers frères Khaled, Hamza, Houcem, et Minou et mes
sœurs Leila Amel et Soumia et leurs enfants surtout le petit
Dadi et Zaki source de joie et de bonheur*

A ma très chère amie Nada, avec qui j'ai beaucoup appris,

A toute ma famille

*A tous mes enseignants qui m'ont accompagné tout au long de
mon parcours académique,*

A tous ceux qui m'aiment

B.Bouthaina

Dédicaces

*Tout d'abord je remercie Allah (mon dieu) de m'avoir donné la
capacité, la volonté et de la patience pour réaliser ce travail.*

*A mes parents, qui m'ont doté d'une éducation digne, leur
amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui*

*A mon père Abdelmadjid ; tu es le meilleur ! le plus supportif et
attentif père dans le monde*

A ma mère, pour tes sacrifices, ton amour et ta patience énorme

*A mes frères 'Abdelbaki ' et 'Akram ' qui mon donnés le monde
par leur soutien*

*A mes belles sœurs 'kanzabelafdhal' et 'Maamiramna ' ; Merci
pour tout votre soutien et vos encouragements, vous êtes les
meilleurs amis du monde*

*A mon ami ' Bougandoura Aymen 'Tu es mon meilleur ami
depuis l'enfance, j'espère que Dieu te protégera*

Et bien sur

*n'oublie pas mes collègues de mémoire : Hafidi Nada et
Bourouba Bouthaina .*

*A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines, You mean a lot
to me*

Abdeldjallil

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. Le levain	2
1. Définition.....	2
1.1. Levain céréalier	2
2. Types de levain	3
3. Propriétés et caractéristiques sensorielles du levain.....	3
4. Les facteurs influencent sur l'activité des levains	4
4.1. L'activité d'un levain	4
4.2. Les facteurs influencés	4
5. Caractéristiques nutritionnelles du levain	5
II. La microflore du levain	7
1. Les bactéries lactiques	7
1.1. Généralités	7
1.2. Habitat.....	7
1.3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques :	7
1.4. Les critères de classification	8
1.5. La classification des bactéries lactiques	8
1.6. Les méthodes d'identification des bactéries lactiques	11
1.7. Action fermentaire des bactéries lactiques	11
1.8. Application des bactéries lactiques	12
2. Les levures.....	13
2.1. Généralités	13
2.2. Habitat.....	14
2.3. Classification des levures	14

2.4. Action fermentaire des levures	14
2.5. Application des levures	15
III. Propriété technologiques des bactéries lactiques et des levures	17
1. La production d'exopolysaccharides	17
2. Pouvoir protéolytique	18
3. Activité amylolytique	19
4. Activité antimicrobienne	19
5. Production des arômes.....	19
6. Activité phytasique.....	20
7. Pouvoir acidifiant	20
MATERIEL ET METHODES	
I. Isolement des bactéries lactiques à partir du levain de blé	21
1. Préparation de l'échantillon	21
2. Préparation des dilutions.....	22
3. Etalement direct	22
4. Dénombrement des bactéries lactiques	22
5. Purification et identification partielle des isolats	22
5.1. Les caractères morphologiques.....	25
6. Test catalase	25
II. Etude des propriétés technologiques des isolats.....	24
1. Criblage des isolats pour la production des exopolysaccharides	25
2. Etude du pouvoir amylolytique des isolats	26
3. Etude du pouvoir protéolytique des isolats.....	27
4. Etude de l'activité antimicrobienne.....	27
4.1. Les souches bactériennes test	27
4.2. Technique de diffusion sur disque	27
5. Antagonisme des levures.....	28
RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Isolements et identifications des BL et des levures à partir du levain de blé	29

1.1. Les caractéristiques macroscopiques des isolats	29
1.2. Test de catalase	30
1.3. Les caractères microscopiques.....	30
1.4. Dénombrement	30
1.5. Purification des BL et des levures.....	33
2. Criblage des bactéries lactiques et des levures pour la production des exopolysaccharides	34
3. Etude du pouvoir protéolytique	36
4. Pouvoir amylolytique	37
5. Antagonisme des levures.....	39
6. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques	41

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Resume

Abstract

ملخص

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

List des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

AL : Acide Lactique

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BL : Bactéries Lactiques

CFU/g : Unité Formant Colonie par gramme

CO₂ : Di-Oxyde de Carbone

EPS : Exo-Poly-Saccharides

HePS : Hétéro-Poly-Saccharides

H₂O : L'eau

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène.

HoPS : Homo-Poly-Saccharides

mDAP : meso-Di Amino Pimélique

MH : Mueller Hinton

MRS : Man Rogosa Sharpe

MRSs : Man Rogosa Sharpe saccharose

NA: Nutriment Agar

NaCl : Chlorure de Sodium

PCA: Plate Count Agar

PDA: Potato Dextrose Agar

pH : potentiel d'Hydrogène

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

YMA: Yeast Mannitol Agar

YPD: Yeast Peptone Dextrose

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1: TYPE DE LEVAIN : (A) LEVAIN DUR / (B) LEVAIN LIQUIDE (ROUSSELET <i>AL</i> ; 2020). ...	3
FIGURE 2 : OBSERVATION DES DIFFERENTES ACTIVITES DES LEVAINS AU MESURE DE POUSSE (ROUSSELET <i>AL</i> ; 2020).	4
FIGURE 3: CLASSIFICATION SIMPLIFIEE DES BACTERIES LACTIQUES ASSOCIEES AUX PRODUITS ALIMENTAIRES (SAWADOGO ; 2010)	9
FIGURE 4: VOIE METABOLIQUE DES BACTERIES LACTIQUES, (A) : VOIE HOMOFERMENTAIRE ; ; (B) : VOIE HETEROFERMENTAIRE (VILLALOBOSE ET AL ; 2020).....	12
FIGURE 5: FERMENTATION ALCOOLIQUE ET ETAPES ENZYMATIQUES AU SEIN DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (OLIVEIRA <i>ET AL</i> ; 2013).....	15
FIGURE 6: LES TYPES DES EPS (SANLIBABA ET ÇAKMAK ; 2016).	18
FIGURE 7: ELABORATION D'UN NOUVEAU LEVAIN-CHEF (URIEN ; 2015).....	21
FIGURE 8: LEVAIN-CHEF PENDANT L'ELABORATION JOURS (1 ; 3 ;6) DE RAFRAICHISSEMENT.	21
FIGURE 9 : PROTOCOLE D'ISOLEMENT DES BL ET DES LEVURES.....	24
FIGURE 10 : PROTOCOLE DE CRIBLAGE DES BL ET DES LEVURES PRODUCTRICES DES EPS.....	29
FIGURE 11 : EXEMPLE DES RESULTATS D'ISOLEMENT, (A) : DES BACTERIES LACTIQUES SUR MILIEUX MRS (B) : DES LEVURES SUR MILIEU SABOURAUD, A PARTIR D'ECHANTILLON DE LEVAIN DE BLE DUR.	29
FIGURE 12 : EXEMPLE DE RESULTATS DE TEST DE CATALASE.....	30
FIGURE 13: EXEMPLE DE REPIQUAGE DES ISOLATS ; (A) : LEVURE SUR SABOURAUT ; (B) : BL SUR GELOSE MRS ; (C) : BL SUR BOUILLON MRS.	34
FIGURE 14 : FILAMENT FORME AU CONTACT D'UNE ANSE DE PLATINE AVEC, (A) : UNE COLONIE DE LEVURE VISQUEUSE ET (B) : UNE COLONIE DE BACTERIE MUÇOÏDE.....	34
FIGURE 15: CONFIRMATION DE LA PRODUCTION D'EPS, (A) :L'ISOLAT DE BACTERIES LACTIQUES DANS L'ETHANOL. (B) : PRECIPITATION DES EPS DANS L'ETHANOL.	35
FIGURE 16:EXEMPLE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES BL DANS MILIEU PCA AU LAIT.	36
FIGURE 17: L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DES LEVURES DANS MILIEU NA AU LAIT.....	36
FIGURE 18: TRAITEMENT DES BL AVEC LUGOL DANS MILIEU MRS ADDITIONNE DE L'AMIDON	37
FIGURE 19 : L'ACTIVITE AMYLOLYTIQUE DES LEVURES DANS MILIEU PDA ADDITIONNE DE L'AMIDON.....	38
FIGURE 20: L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES ISOLATS DES BACTERIES LACTIQUES CONTRE (A): <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ; (B) : <i>PSEUDOMONASSP.</i> (C) : <i>E. COLI</i>	41

Liste des tableaux

TABLEAU1: COMPOSITION GLOBALE DES GRAINS ENTIERS DE CEREALES (SAWADOGO; 2010)....	2
TABLEAU2: COMPOSITION NUTRITIONNELLE MOYENNE POUR 100 GRAMMES DE LEVAIN (ROUSSEL ET AL ; 2020).	5
TABLEAU3: LES CARACTERISTIQUES DES PRINCIPAUX GENRES DES BACTERIES LACTIQUES (+ : POSITIF ; - : NEGATIF ; ± : REPONSE VARIABLE SELON LES ESPECES) (BELARBI ; 2011).....	10
TABLEAU4: UTILISATIONS DES BACTERIES LACTIQUES DANS LA FERMENTATION ALIMENTAIRE ET EXEMPLES DES ESPECES PREDOMINANTES (MECHAI ; 2009).	13
TABLEAU 5 : UTILISATION DES LEVURES ET DE LEURS PRODUITS (LAMMI ; 2011).....	16
TABLEAU6: CARACTERISTIQUES MICROSCOPIQUES DES 18 ISOLATS DU LEVAIN.	31
TABLEAU7: CARACTERISTIQUES MICROSCOPIQUES DES ISOLATS DES LEVURES SELECTIONNES ET PURIFIES.	33
TABLEAU 8 : LES RESULTATS DES ACTIVITES AMYLOLYTQUES ET PROTEOLYTIQUES DES BACTERIES LACTIQUES ET PRODUCTION DES EPS.	38
TABLEAU9: LES RESULTATS DES ACTIVITES AMYLOLITQUES ET PROTEOLYTIQUES DES LEVURES ET PRODUCTION DES EPS.	39
TABLEAU 10 : LES RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTAGONISTE DES LEVURES CONTRE LES MOISSURESCH1, CH2.....	40
TABLEAU 11 : LES RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES BACTERIES LACTIQUES CONTRE DES SOUCHES PATHOGENES (<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> , <i>ESCHERICHIA COLI</i> ET <i>PSEUDOMONAS SP</i>).....	42

Introduction générale

Les écosystèmes microbiens ont une importance majeure dans les aliments fermentés qui représentent une forte proportion de notre alimentation. Ces alimentations traditionnelles ont vu leur importance croître ces dernières années grâce à leur typicité et leurs qualités organoleptiques souhaitables. Ils représentent donc une part importante de notre ration alimentaire journalière et d'autre part ils constituent des produits d'innovation dans l'industrie alimentaire (**Minervini et al ; 2014**).

Parmi les écosystèmes fermentaires utilisés dans l'industrie de la boulangerie les levains qui sont les premiers agents utilisés dans la fermentation panair. Ils renferment une microflore acidifiante, constituée essentiellement de bactéries lactiques et de levures (**Franco et al ; 2020**). Ces dernières peuvent tenir parmi les plus importants groupes de microorganismes utilisés dans les fermentations alimentaires (**Abriouel et al ; 2012**).

Cette microflore isolée à partir d'aliments céréaliers a la capacité de fermenter les hydrates de carbone et à dégrader les protéines et les lipides. Ainsi la synthèse d'une large gamme de composés tels que les exopolysaccharides, les acides organiques, les peptides, les composés antimicrobiens et aromatiques. Ces métabolites peuvent contribuer aux caractéristiques organoleptiques, technologiques et nutritionnelles des aliments fermentés (**Milanovic et al ; 2020**). Comme la levure quant à elle contribue majoritairement à une bonne levée de la pâte (**Penka et Kaloyan ; 2020**).

L'objectif de ce travail consiste à isoler des bactéries lactiques et des levures autochtones d'origine céréalière à partir du levain traditionnel du blé dur, et d'estimer quelques aptitudes technologiques notamment la production d'EPS. Quelques activités enzymatiques (protéolytiques et amylolytiques) et antibactériennes ont également été testées.

Notre manuscrit est structuré en trois parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique articulée autour d'un premier chapitre sur le levain. Le deuxième chapitre sur la microflore du levain, les bactéries lactiques et les levures. Le troisième chapitre concernant les propriétés technologiques des levures et des bactéries lactiques.

Dans la deuxième partie du manuscrit nous exposons la partie matériel et méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Elle comporte la détermination de quelques paramètres microbiologiques, ainsi que l'étude des propriétés technologiques des isolats. La dernière partie du manuscrit est consacrée aux résultats et discussion et ce termine par une conclusion générale et perspectives.

Le levain

I. Le levain

1. Définition

Le mot "levain" provient du terme latin "*levare*" qui signifie "lever" (**Drider et Prévost ; 2014**). C'est un terme générique polyvalent qui est utilisé dans de nombreux domaines industriels notamment (panification, brasserie, produits laitiers fermentés, etc...). Le levain est un produit intermédiaire pour la préparation de la pâte et du pain (**Vuyst et Neysens ; 2005**).

C'est une pâte pré-fermentée composée d'un mélange de farine et d'eau fermenté spontanément sans apport volontaire de levure, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte (**Rousselet *al* ; 2020**). Il s'agit d'un système biologique complexe en évolution permanente, renferme une microflore acidifiante composée de bactérie lactique et de levure, qui sont les principaux agents de la fermentation et de la production d'acidité et d'arôme (**Milanovic *et al* ; 2020**).

1.1. Levain céréalier

Le principale composant du levain est les céréales font partie des aliments riches en nutriments qui constituent un milieu favorable pour les fermentations microbienne. Elles sont riches en hydrates de carbone, qui sont utilisés comme source de carbone et d'énergie par les microorganismes (**Tableau 1**). Également facteurs de croissance qui favorisent le développement des microorganismes, mêmes les plus exigeantes comme les bactéries lactiques (**Sawadogo ; 2010**).

Tableau 1: Composition globale des grains entiers de céréales (**Sawadogo; 2010**).

Constituants	Teneur (% ms)
- Polysaccharides totaux	70-80
• Amidon	45-77
• Fibres brutes y compris lignine	9-15
• Hydrates de carbone de faible poids moléculaire (fructose, glucose, saccharose, raffinose etc ...)	2-5
- Protéines	8-15
- Lipides	2-6
- Cendres (sels minéraux totaux)	1,5-3

2. Types de levain

Selon le niveau de l'hydratation on distingue deux types de levain :

a) **Levain dur** : La panification traditionnelle au levain s'effectue avec un levain dur, cultivé dans une pâte peu hydratée (**Figure 1**) et conservé au frais entre deux panifications. Il représente une moyenne de 15 à 25 % de la pâte, pour une durée de panification de 6-7 heures (**Roussel et al ; 2020**).

b) **Levain liquide** : Le levain liquide (**Figure 1**) est plus utilisé en France. Il est basé sur le même principe de fabrication que le levain dur. L'avantage du levain liquide réside dans la facilité à le rafraîchir. Il suffit de rajouter la même quantité d'eau et de la farine dans une machine qui brasse et fermenter le mélange (**Roussel et al ; 2020**).

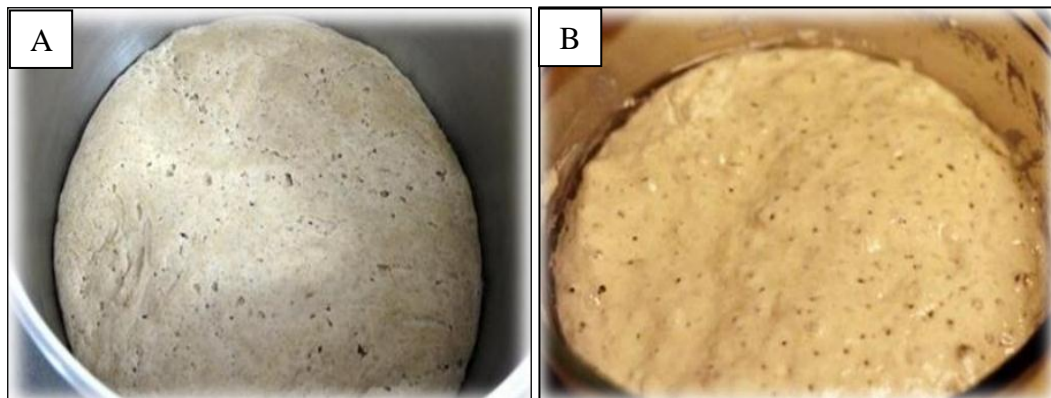


Figure 1: Type de levain : (A) levain dur / (B) levain liquide (**Rousselet al ; 2020**).

3. propriétés et caractéristiques sensorielles du levain

Les levains ont été caractérisé en fonction du type de technologie appliquée pour leur production, telle qu'elle est utilisée dans les procédés artisanaux et industriels (**Roussel et al ; 2020**).

- **Type I** : correspond aux levains traditionnels entretenus par rafraîchis successifs.
- **Type II** : levain en général issu d'une fermentation unique avec utilisation de starters.
- **Type III** : levain déshydraté obtenu par séchage d'un levain de type I ou II.

4. Les facteurs influencent sur l'activité des levains

4.1. L'activité d'un levain

L'activité d'un levain est évaluée par l'observation et associée à la production gazeuse liée à l'activité microbienne (**Figure2**). Dans le cas d'un levain dur l'activité s'apprécie par la vitesse et le niveau de développement de la pâte, avant qu'elle ne devienne poreuse, par contre lorsque le levain est liquide l'activité s'apprécie par la quantité de bulles de gaz qui se forme sur la partie supérieure de la pâte (**Roussel et al ; 2020**).

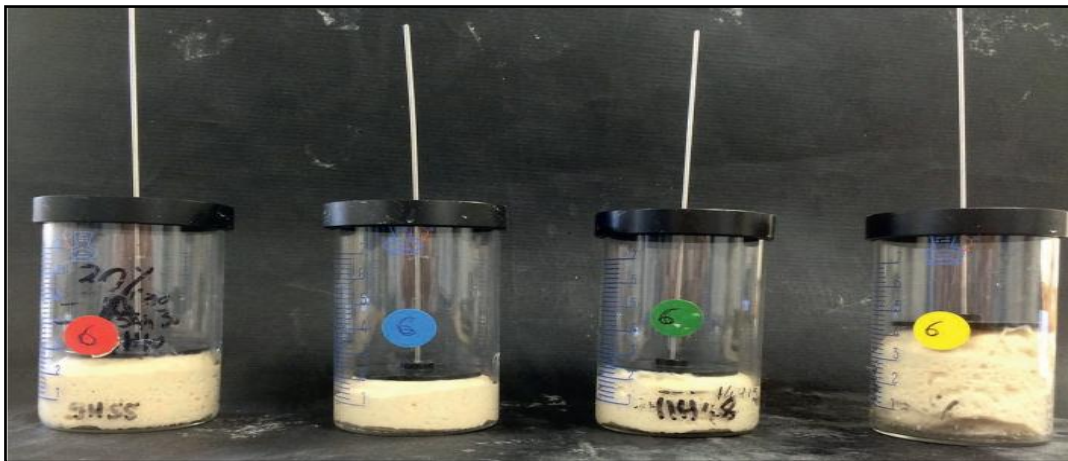


Figure 2 : Observation des différentes activités des levains au mesure de pousse (**Rousselet et al ; 2020**).

4.2. Les facteurs influencés

L'influence des paramètres les plus étudiés sur le microbiote dominant du levain est discutée ci-dessous (**Minervini et al ; 2014**).

- **Température** : la chaleur accroît l'activité biologique. Le levain démarre alors rapidement et son acidité augmente. comprise entre 20 et 28°C.
- **L'hydratation** : L'hydratation va de 50% pour les levains durs. Et de 100–120% pour les levains liquides. L'augmentation de l'hydratation favorise l'activité microbologique et enzymatique. A forte hydratation l'acidité lactique est favorisée par rapport à l'acidité acétique.
- **Influence du Sel** : le sel a une action inhibitrice sur les levures et les bactéries. Son incorporation contribue à ralentir la fermentation, et aussi il limite l'action pénalisante de l'hydrolyse des pâtes.

- **L'acidité du milieu** : Une acidité du milieu comprise entre un pH de 4 et 5,5. Est favorable à l'activité des levures et des bactéries.
- **L'oxygénation du milieu**: la multiplication des levures est fortement accélérée en milieu aérobie. Les rafraîchis sont favorables à l'oxygénation du milieu et donc à l'augmentation des levures.
- **La composition du milieu** : la faible fraction de sucres simples dans les farines blanches contribue à une certaine lenteur dans le démarrage des levains (Minervini et al; 2014).

5. Caractéristiques nutritionnelles du levain

Les levains ont des fonctionnalités intéressantes en panification. Ils nuancent en premier lieu la texture - densité, moelleux, ouverture de la mie, épaisseur et couleur de la croûte -, et aussi la conservation (Milanovic et al ; 2020).

La valeur nutritionnelle du produit obtenu par fermentation lactique peut être améliorée par la destruction de substances toxiques ou indigestes, par l'apparition de facteurs de croissance d'origine microbienne (vitamines, acides aminés), ou de manière plus générale par une importante modification de la composition (Tableau 2), de la texture et des propriétés organoleptiques des produits fermentés (Sawadogo ; 2010).

Tableau 2: Composition nutritionnelle moyenne pour 100 grammes de levain (Roussel et al ; 2020).

Nutriment	Dans 100g de levain
Lipides	1,8g
• Acides gras saturés	0,5g
• Acides gras poly-insaturés	0,8g
• Acides gras mono-insaturés	0,3g
• Cholestérol	0
Glucides	56g
Fibres alimentaires	2,4g
protéines	12g
Vitamines C	0,2mg
Calcium	44mg
Fer	3,4mg
Magnésium	28mg
Sodium	513 mg
Potassium	128mg

Microflore du levain

II. La microflore du levain

1. Les bactéries lactiques

1.1. Généralités

Les bactéries lactiques BL sont des microorganismes procaryotes, très anciens dont les ancêtres auraient pu voir le jour il y a trois milliards d'années, elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques (**Dridier et Prévost ; 2014**). Ces microorganismes utiles à l'homme lui permettant de fabriquer de nombreux aliments comme les fromages, charcuteries, les boissons fermentées, la boulangerie...etc. (**Badis et al ; 2005**).

Avant le vingtième siècle, l'appellation « bactéries lactiques (Lactic acid bacteria) » a été utilisée pour signifier les organismes du lait acidifié (Milk-souring organisms). Significativement, la première culture bactérienne pure serait d'ailleurs une culture de *Lactococcus lactis* à partir du lait, obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873 (**Belarbi ; 2011**).

Les BL sont très hétérogènes (**Sadi et al ; 2017**) de point de vue morphologique, physiologique et biochimique, Elles permettent par leur métabolisme d'augmenter la durée de conservation des denrées et leur confèrent une saveur et une texture différente (**Guertani ; 2018**).

1.2. Habitat

Dans la nature, les bactéries lactiques sont ubiquitaires et susceptibles d'être retrouvées dans tous types d'habitats (**Tahlaiti ; 2019**), mais leurs principaux habitats sont: les produits alimentaires fermentés ou non fermentés comme le lait et produits laitiers, les produits de panification, les viandes, les poissons, les plantes et les fromages...etc (**Sawadogo ; 2010**).

1.3. Caractéristiques principales des bactéries lactiques :

Les BL sont des microorganismes unicellulaires, à Gram positive, hétérotrophes et chimio-organotrophes (**Tableau 3**). Elles ont un métabolisme anaérobie facultatif et ne produisent pas de catalase, immobiles, non sporulées, sous formes de coques ou de bâtonnets.

Ces microorganismes produisant de l'acide lactique, de ce fait, elles tolèrent des pH acides généralement à pH 4,0 - 4,5 et certaines sont encore actives à des valeurs de pH extrêmes comme 9,6 ou 3,2.

Les BL se développent à différentes températures, celles qui se développent entre 25°C et 30°C dites mésophiles et entre 40°C - 44°C dites thermophiles (**Roudj ; 2012**). Autres espèces peuvent se développer à des températures inférieures à 5°C et supérieures à 45°C (**Waters et al ; 2015**).

Nombreuses bactéries se caractérisent par leurs besoins nutritionnels particulièrement complexes comme les glucides fermentescibles, les vitamines, les acides aminés ou les peptides et les acides gras (**Tahlaiti ; 2019**).

1.4. Les critères de classification

Les critères de classification bactérienne est fondée sur les caractéristiques morphologique et physiologique auxquelles s'est ajoutée la composition pariétale, les acides gras, mais les caractéristiques moléculaires comme le pourcentage de G+C de l'ADN, l'hybridation ADN-ADN, la structure et la séquence des ARNr, sont devenus des outils taxonomiques importants. Ces outils ont conduit à des changements notables dans la classification des BL (**Drider et Prévost ; 2014**).

Les caractéristiques morphologiques et fermentaires permettent de distinguer les genres et les espèces (**Tableau 4**). Les BL sont caractérisées par un métabolisme hétéro-fermentaire ou homofermentaires, les bactéries homo-fermentaires produisent de l'acide lactique (AL) à partir du glucose ou fructose, les bactéries hétéro-fermentaires produisent en plus de l'AL du CO₂, de l'éthanol et de l'acide acétique a partir du glucose (**Arora et al ; 2021**).

1.5. La classification des bactéries lactiques

Selon des critères cités les BL sont classées en phylum des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales* (**Zidani ;2015**). Renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire illustrés dans la **Figure 3 (Drider et Privost ; 2009)**.

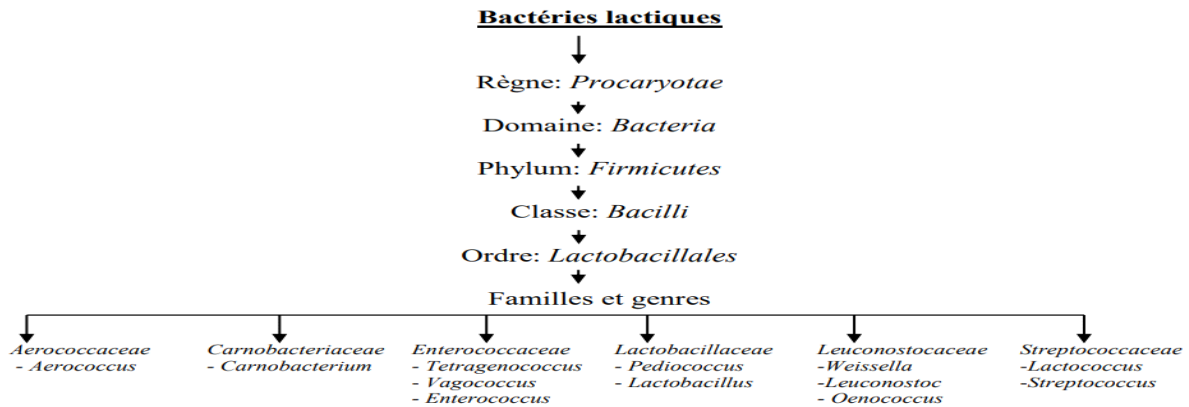


Figure 3: Classification simplifiée des bactéries lactiques associées aux produits alimentaires (Sawadogo ; 2010)

A. Les coques lactiques

Elles appartiennent aux familles des *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Aerococcaceae*, *Leuconostocaceae*, et *Lactobacillaceae*. Les cellules sont groupées en paires ou en chaînes et de longueurs variables. La différenciation des genres est basée sur l'arrangement des cellules et sur le type de fermentation lactique (homo et hétérolactique).

Certains ont des activités protéolytiques et lipolytiques. Actuellement, ils regroupent les genres : *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (Bekhouche ; 2006).

B. Les bacilles lactiques

- **Le genre *Lactobacillus* :**

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques, il appartient à la famille des *Lactobacillaceae*. Les souches des lactobacilles sont constituées de bacilles long et fin (parfois incurvés) ou coccobacilles (Bekhouche ; 2006).

Selon la classification d'Orla-Jensen (1919) Les lactobacilles sont subdivisés, en trois sous genres : *Thermobacterium*, *Bétabacterium*, *Streptobacterium*. Cette classification tenait compte essentiellement de la répartition des voies de fermentation chez ces bactéries.

- ✓ **Les lactobacilles homofermentaires stricts :** regroupent les espèces de l'ancien sous-groupe *Thermobacterium*, qui dégradent les hexoses en acide lactique.

- ✓ **Les lactobacilles hétérofermentaires stricts** : regroupent les espèces de l'ancien sous-groupe *Bétabacterium*, fermentent les hexoses en acide lactique, en acide acétique ou en éthanol et CO₂.
- ✓ **Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs** : regroupent les espèces de l'ancien sous-groupe *Streptobacterium*, métabolisent les hexoses en acide lactique par voie homofermentaire d'Emden-Meyerhof-Parnas et dégradent les pentoses par voie hétérofermentaire (Mechai ; 2009).

- **Le genre *Carnobactérium* :**

Il appartient à la famille des *Carnobacteriaceae*. Les souches de *Carnobactérium* sont morphologiquement proche des lactobacilles (petit bâtonnets isolés, par paire ou en courtes chaînes) à métabolisme hétérofermentaires, ce genre comprend quatre espèces fréquemment associées aux aliments (Belarbi ; 2011).

Tableau3: les caractéristiques des principaux genres des bactéries lactiques (+ : positif ; - : négatif ; ± : réponse variable selon les espèces) (Belarbi ; 2011).

Genres	Morphologie cellulaire	Type de fermentation	Croissance à température		Croissance en présence de NaCl		Croissance à pH		Isomère d'acide lactique
			10C°	45C°	6,5%	18%	4,4	9,6	
<i>Lactobacillus</i>	Bâtonnet	Homo/Hétéro	±	±	±	-	±	-	D,L,LD
<i>Lactococcus</i>	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Leuconostoc</i>	Cocci	Hétéro	+	-	±	-	±	-	D
<i>Oenococcus</i>	Cocci	Hétéro	+	+	±	-	±	-	D
<i>Pediococcus</i>	Cocci; tétrade	Homo	±	±	±	-	+	-	D,L,LD
<i>Streptococcus</i>	Cocci	Homo	+	-	-	-	-	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	Cocci; tétrade	Homo	+	-	+	+	-	+	L
<i>Aerococcus</i>	Cocci; tétrade	Homo	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	Bâtonnet	Hétéro	+	-	-	-	-	-	L
<i>Enterococcus</i>	Cocci	Homo	+	+	+	-	+	+	L
<i>Vagococcus</i>	Cocci	Homo	+	-	-	-	±	-	L
<i>Weissella</i>	Cocci	Hétéro	+	-	±	-	±	-	D,L,LD

1.6. Les méthodes d'identification des bactéries lactiques

L'identification des BL a été proposée la première fois par Schillinger et Lucke en (1987). Cette identification est basée sur la comparaison des caractéristiques physiologiques, et biochimiques typiques des différentes espèces. Néanmoins cette clef permettait uniquement d'orienter l'identification et non une identification précise (**Belarbi ; 2011**).

➤ Les méthodes classiques

Ces méthodes sont basées sur les caractéristiques phénotypiques, elles regroupent toutes les méthodes qui n'impliquent pas le matériel génétique (ADN, ARN). La morphologie.

Ainsi que les méthodes physiologiques, métaboliques/biochimiques et chimiotaxonomiques sont les plus utilisées (**Sawadogo ; 2010**).

- Les méthodes métaboliques ou biochimiques incluent, principalement, la production de gaz à partir de glucose.
- Les méthodes physiologiques incluent, principalement, la croissance à certaines températures, à certaines concentrations de sel et sur gélose citraté. Le profil d'hydrolyse des sucres, l'hydrolyse de l'arginine et la détermination de la configuration de l'acide lactique.
- Les méthodes chimiotaxonomiques incluent, principalement, la détection de l'acide meso-diaminopimélique (mDAP) dans le peptidoglycane (**Mechai ; 2009**).

➤ Les méthodes moléculaires

Ces méthodes basées sur les caractéristiques génétiques, Les principales caractéristiques génétiques utilisées pour l'identification des bactéries lactiques sont :

- Le contenu en guanine et cytosine (G+C%) de l'ADN.
- L'hybridation ADN-ADN.
- L'hybridation ADN-ARN.
- Le séquençage de l'ARNr.
- Les sondes oligonucléotidiques.
- L'analyse du chromosome entier (**Sawadogo ; 2010**).

1.7. Action fermentaire des bactéries lactiques

Les bactéries qui jouent un rôle fermentaire lors de la mise en place d'un levain sont des BL (Urien ; 2015). Les BL présentent une activité homo- et/ou hétéro-fermentaire, dont dépend la fermentation des hexoses, c'est-à-dire des sucres à six atomes de carbone. La voie métabolique homofermentaire des bactéries lactiques permet la production de lactate à partir d'une molécule de fructose et d'une molécule de glucose. La voie métabolique hétérofermentaire des bactéries lactiques permet la production de lactate, de CO₂, d'acétate et d'éthanol (Figure 4) (Villalobose et al ; 2020).

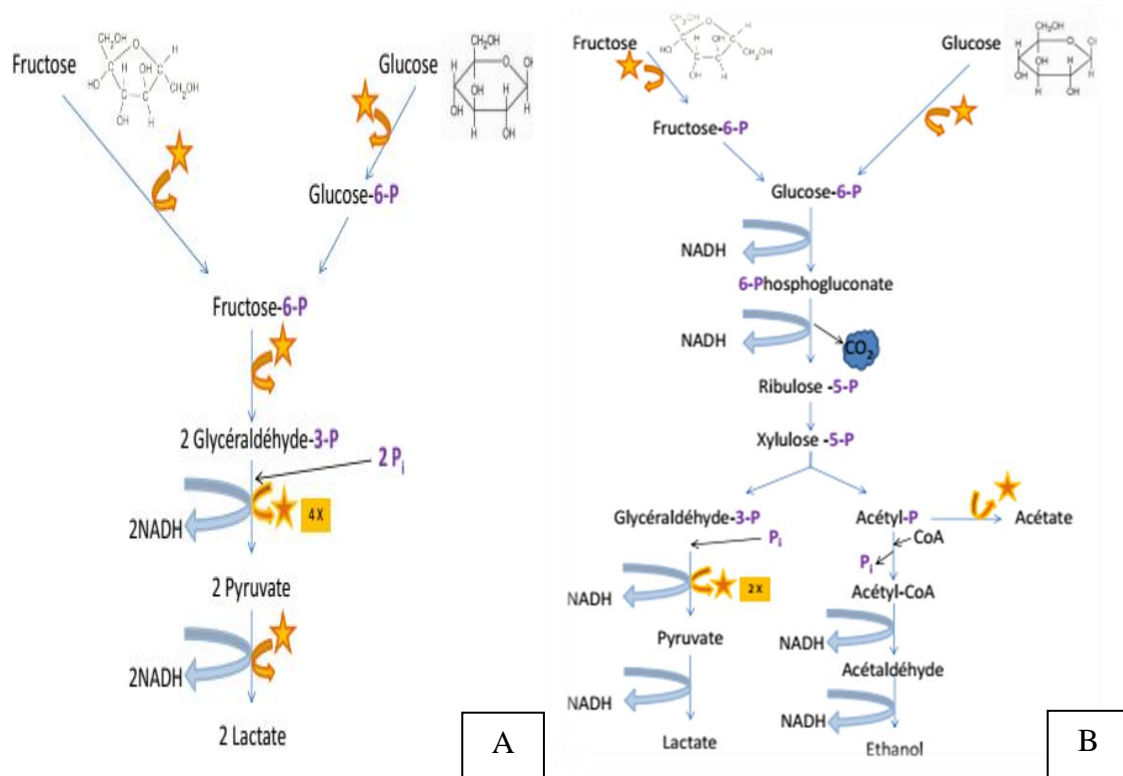


Figure 4: Voie métabolique des bactéries lactiques, (A) : voie homofermentaire ; (B) : voie hétérofermentaire (Villalobose et al ; 2020).

1.8. Application des bactéries lactiques

Les caractéristiques métaboliques des BL en font des acteurs indispensables au cours des fermentations alimentaires. Les bactéries lactiques sont classiquement impliquées dans un grand nombre de fermentations alimentaires, seules ou avec d'autres micro-organismes (transformation du lait, boissons fermentées, salaison, fermentation des végétaux), et sont également étroitement associées à l'environnement humain (Tableau 4) (Li et al ; 2018).

Tableau 4: Utilisations des bactéries lactiques dans la fermentation alimentaire et exemples des espèces prédominantes (Mechai ; 2009).

Applications	Espèces utilisées
Fermentations des végétaux	<i>Ln.mesenteroides, P.pentosaceus, Lb.plantarum</i>
Fermentations de viandes et poissons	<i>Lb.plantarum, P.acidilactici</i>
Boissons alcoolisées	<i>Oenococcusoeni, Lb.delbruekii</i>
Café et cacao	Bactéries lactiques varies
Sauce de soja	<i>Lb.delbruekii, P.soyae</i>
Aliments fermentés indigenes	Bactéries lactiques varies
Ensilage	<i>Lb.plantarum</i>
Probiotiques	<i>Lb. acidophilus, Lb. casei</i>
Pain au levain	<i>Lb.plantarum, Lb. brevis, Lb. sanfranciscensis, Lb. fermentum</i>
Biscuits	<i>Lb.plantarum, Lb. brevis, Lb. leichmannii, Lb. casei</i>
Produits laitiers fermentés	<i>Lc. Lactissubsp lactis, Lc.lactissubspcremoris, Lc. Lactissubspplatisbiovardiacetylactis, Ln.mesenteroidessubspcremoris, Ln. lactis, St. Thermiphilus, Lb.delbruekiisubsp. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb. acidophilus</i>

2. Les levures

2.1. Généralités

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires qui ont la propriété de vivre et de se multiplier. Elles sont les premiers micro-organismes utilisés par l'homme depuis les millénaires, en particulier dans la fabrication des boissons alcoolisées et de pain par fermentation. Elles sont également les premiers micro-organismes à être observés au microscope par A. Van Leeuwenhoek en 1680 qui les a dessinées (**Berber ; 2017**).

L'une des levures les plus connues ces dernières années est la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui est utilisée comme un organisme clé pour l'identification et la compréhension des mécanismes moléculaires, à la base des fonctions fondamentales de toutes les cellules eucaryotes. A ce jour, cette levure est considérée comme cellule modèle en microbiologie et reconnue comme la « levure de boulanger » indispensable en panification (**Nguyen ; 2016**).

Les cellules des levures sont généralement ovoïdes et leur taille varie de 1 à 30 µm. Deux modes de reproduction végétative peuvent être rencontrés par ces micro-organismes : le bourgeonnement ou par fission binaire (**Bekki ; 2014**).

Les levures se différencient nettement des bactéries par leur structure cellulaire eucaryote, le cytoplasme contient les organites habituels des végétaux supérieurs non photosynthétiques (Merabti ; 2006).

2.2. Habitat

Les levures sont ubiquitaire, peuvent coloniser l'air, le sol, l'eau mais elles se trouvent principalement sur les végétaux riches en sucres directement assimilables ou dans des aliments tels que le pain, les céréales, le levain (ex : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fibuligera*...). Les levures utilisatrices de lactose se rencontrent ainsi dans les produits laitiers.

Les levures des produits alimentaires n'étant pas pathogènes, elles ne causeront pas d'intoxication alimentaire mais peuvent produire par leur développement des altérations de la qualité marchande de ces aliments. Mais un petit nombre de levures pathogènes sont à signaler, tout spécialement *Candida albicans* responsable du muguet des jeunes enfants, des vaginites...etc. et *Cryptococcus neoformans* qui provoquer des méningites fatales...(Bekki ; 2014).

2.3. Classification des levures

Selon la classification de Kreger-Van (1984), Les levures se divisent en 3 grandes classes:

- Les ascomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou ascospores sont endogènes et enfermés dans une structure issue du zygote : l'asque.
- Les basidiomycètes : genres sexués, où les produits de la méiose ou basidiospores (chez les levures sont souvent appelés ballistospores) sont exogènes et émis à l'extérieur du zygote.
- Les deutéromycètes ou levures imparfaites : genres asexués ne se multipliant que par reproduction végétative (Merabti ; 2006).

2.4. Action fermentaire des levures

Les levures peuvent être transformées le sucre en gaz carbonique et en alcool, ce que l'on appelle une fermentation, à la base de la montée de la pâte à pain. Pasteur est le premier exprimé la théorie de la fermentation : la levure peut vivre aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène, dans le premier cas, elle se multiplie, dans le second cas, elle réalise la fermentation (Figure 5). Il existe plusieurs souches de levures, que les chercheurs ont sélectionnées : celles utilisées pour le pain sont différentes de celles utilisées pour le vin, la

bière... parce qu'elles adaptées à des supports différents : céréales, raisin, malt (orge germée), et qu'elles donnent des arômes particuliers (Oliveira *et al* ; 2013 ; Urien ; 2015).

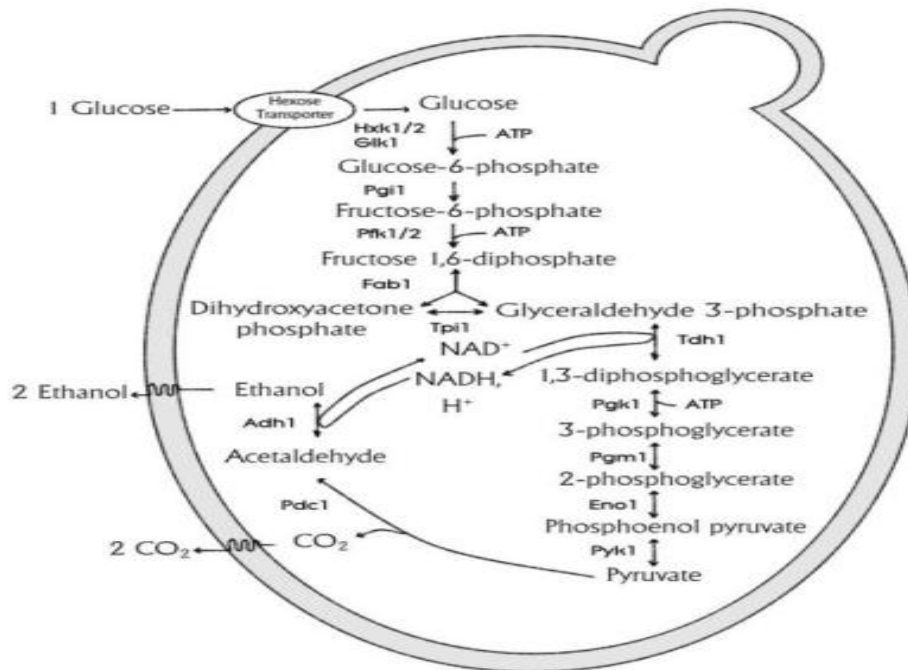


Figure 5: Fermentation alcoolique et étapes enzymatiques au sein de *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira *et al* ; 2013).

2.5. Application des levures

Au cours de la préparation du pain, la levure se développe en aérobiose. Ce type de développement, augmente la production de CO₂ et diminue l'accumulation d'alcool ; ce qui donne la texture légère de nombreux pains et les traces de fermentation contribuent au goût final.

Ce pendant, en conditions anoxiques, les levures dirigent leur métabolisme vers la fermentation avec une production significative d'alcool. L'industrie alimentaire étant constamment en recherche de développement de nouveaux produits, les levures présentent de nouvelles pistes d'exploitation (Lammi ; 2011).

Au-delà de leur importance en panification et en brasserie, les levures sont utilisées pour leurs cellules elles mêmes ou pour les composés extraits de ces cellules (Tableau 5).

Tableau 5: Utilisation des levures et de leurs produits (Lammi ; 2011).

Utilisation	Quelques exemples
Production de levure	Levure de boulanger (fabrication du pain) Levure sèche (supplément nutritionnel humain et animal)
Produits des levures	Extrait de levure (milieux de culture de microorganismes) vitamines B et D enzymes : invertase, galactosidase,(industrie agroalimentaire) produits chimiques pour la recherche :ATP, NAD ⁺ ,ARN
Produits de fermentation de levures	Ethanol (chimique, industriel, carburant). Glycérol

Propriété technologique

III. Propriété technologique des bactéries lactiques et des levures

1. La production d'exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) sont des macromolécules organiques à chaînes longues linéaires ou ramifiées composés d'unités de sucre dans différents rapports qui comprennent principalement le glucose, le galactose, le rhamnose, ...etc (**Guérin et al ; 2020**).

Les EPS sont des composés de métabolites secondaires synthétisés par des différentes souches des bactéries lactiques et des levures à l'aide de différentes sources de carbone au cours du processus de fermentation. Ces métabolites sont présents en deux formes soit des capsules étroites liées à la cellule bactérienne ou sous forme de boue mal fixée ou excrète (**Maria et al ; 2015 ; Gientka et al ; 2016**). Au niveau bactérien, les EPS jouent un rôle important dans le contrôle des caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire (**Phu-Tho et al ; 2020**).

Ils ont été dosés en tant que texturants fonctionnels et donnent un bon potentiel pour remplacer les additifs chimiques hydrocolloïdes qui améliorent la qualité du pain (**Milanovic et al ; 2020**). Les BL productrices d'EPS peuvent être incorporées dans le levain fermenté pour avoir un effet positif sur les propriétés techno-fonctionnelles des produits de boulangerie (**Dominika et al ; 2022**).

La composition du milieu (sources de carbone et d'azote, vitamines, minéraux, etc.), et les conditions de croissance (température, agitation, temps d'incubation, pH, tension d'oxygène, etc.) sont des facteurs importants pour le rendement total des EPS produits par les bactéries et les levures (**Gientka ; 2016 ; Kashika et al ; 2021**).

Les exopolysaccharides sont variés et peuvent être classés selon différents critères. La plus classique est basée sur leur composition en monomères ce qui permet de les classer en deux grands groupes : les homopolysaccharides (HoPS) et les hétéropolysaccharides (HePS) (**Figure 6**).

La capacité à produire des HoPS et des HePS par des BL pendant la fermentation du levain dépend de l'activité métabolique du microbiote de fermentation (**Phu-Tho et al, 2020**).

La production des EPS pourrait améliorer d'une part l'absorption de l'eau dans les pâtes, leur machinabilité et d'autre part le volume du pain ainsi que sa conservation en retardant le phénomène de rassissement (**Dridier et Prévost ; 2014**).

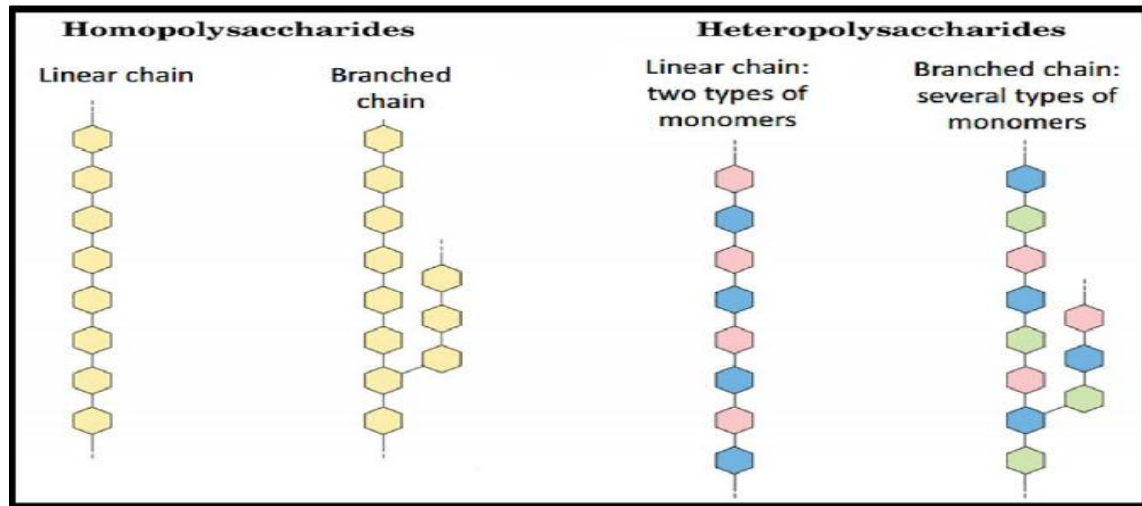


Figure 6: Les types des EPS (Sanlibaba et Çakmak ; 2016).

2. Pouvoir protéolytique

Les protéines des milieux fermentés sont dégradés soit par l'activité protéolytique bactérienne, soit par l'activation des protéases de la farine en milieu acide (**Dridier et Prévost ; 2014**). Les BL perdent leur activité provoquent l'augmentation des protéines solubles, peptides et des acides aminés dans la pâte. La plupart des protéases microbiennes sont spécifiques. Elles agissent aussi bien sur les protéines que sur les oligopeptides, il s'agit des enzymes généralement exocellulaires (**Guiraud ; 2003**).

Les BL sont incapables de synthétiser plusieurs acides aminés, mais sont pourtant bien adaptées à un environnement riche en protéines et pauvre en acides aminés libres ; comme le lait ; grâce à un système protéolytique bactérien complexe (**Khunnamwong et al ; 2020**).

Les levures peuvent également améliorer la digestibilité du pain, puisque des activités protéolytiques ont été détectées dans certains levains riches en levure. Ainsi, une augmentation du pool d'acides aminés libres. De plus, la technologie de fermentation au levain semble être appliquée avec succès pour obtenir des produits de boulangerie sans gluten (**Chiva et al ; 2020**).

Le développement de la saveur (goût et odeur) est lié au métabolisme des acides aminés. En effet, les enzymes protéolytiques produites par les microorganismes pendant la fermentation sont des composants responsables de la saveur et la mie de pain ne dépend des réactions enzymatiques qui sont en cours lors du processus de fermentation (**Urien ; 2015**).

3. Activité amylolytique

Les BL et les levures ont la capacité d'hydrolyser l'amidon et ses produits de dégradation (dextrines, oligosaccharides) par les enzymes amylolytiques. Les α -amylases jouent un rôle important car elles sont responsables de la dégradation de l'amidon en sucres simples (**Gänzle ; 2014**).

Les BL et les levures amylolytiques sont très souvent isolées des céréales et participent à la production d'aliments fermentés depuis des siècles. *Lactobacillus amylovorus* est l'une des premières nouvelles espèces de BL décrites capables de dégrader l'amidon, ainsi que d'autres glucides probiotiques (**Penka et Kaloyan ; 2020**).

La production gazeuse dépend de la disponibilité en substrats : substrats préexistants dans la pâte et issus de l'activité amylasique libérant du maltose et d'autres composés fermentescibles (**Roussel ; 2014**).

4. Activité antimicrobienne

Dans les aliments fermentés, les bactéries lactiques et les levures présentent une variété d'activités antimicrobienne.

Les BL ont la capacité de la préservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits alimentaires et l'augmentation de la durée de conservation (**Tahlaiti ; 2019**). En effet, les BL produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes tels que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyl, la reutérine et les bactériocines. L'activité antimicrobienne des bactériocines a un effet soit bactéricide, provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la croissance bactérienne (**Tahlaiti ; 2019**).

Les levures killer sont étudiées en vue de leurs exploitations pour des applications potentielles. Dans les fermentations industrielles, pour combattre les levures et les moisissures indésirables de contamination (**Lammi ; 2011 ; Khunnamwong et al ; 2020**).

5. Production des arômes

Les bactéries lactiques sont capables de produire des différents composés aromatiques comme l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et l'éthanol... à partir de lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses (**Benyoucef ; 2018**). Les levures aussi peuvent produire des composés aromatiques tels que les alcools (**Chiva et al ; 2020**).

Ces sécrétions diminuent l'effet négatif de certains métabolites au cours de la fermentation (comme l'acide phytique) (Urien ; 2015 ; Aslankoohi et al ; 2016).

6. Activité phytasique

La fermentation produite par BL se traduit également dans la biodisponibilité minérale du pain et une teneur réduite en phytates. L'acide phytique (myoinositol 1,2, 3, 4, 5,6-hexakis dihydrogénophosphate), est la principale forme de stockage de phosphore dans les grains de céréales, il peut être dégradé par le phytase, une enzyme qui catalyse la phytate (Milanovic et al ; 2020).

L'activité phytasique augmente le phosphore disponible. En augmentant l'activité de la phytase ou en ajoutant des bactéries lactiques actives à base de phytase ; de la levure ou d'autres micro-organismes. Parmi les microorganismes producteurs de phytases, on citera les levures : *Saccharomyces cerevisiae*, et les bactéries lactiques comme *Lactobacillus brevis*. Tout en améliorant les qualités texturales du pain (Nuobariene et al ; 2015).

7. Pouvoir acidifiant

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des BL utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Kihal ; 2013).

Au sein de levain, la production élevée des acides diminue le PH. Néanmoins, les taux d'acidification élevés indiquent une accélération de la fermentation du levain pour le rendre apte au niveau artisanal et surtout au niveau industriel. Afin de réaliser une caractérisation technologique des souches, il est utile de mesurer l'activité acidifiante (Aslankoohi et al ; 2016).

Materiel et méthodes

2. Préparation des dilutions

Dans un bécher stérile, 90mL d'eau péptonée (1% peptone + 0.9% NaCl) sont mélangées avec 10g d'échantillon (levain) (Celano et al ; 2018 ; Chiva et al ; 2021). La solution est ensuite homogénéisée avec agitation pour obtenir la première dilution (10^{-1}) à partir de cette dernière une série de dilutions décimales sont réalisées jusqu'à la dilution (10^{-6}).

3. Etalement direct

Prélèvement d'un volume 0,1mL de chaque tube de dilution est directement étalé à la surface des milieux MRS pour les BL, et sabouraud (Annexe 1) a été utilisé pour les levures. Les BL ont été incubés en anaérobiose à 30°C pendant 48 H, tandis que les levures ont été incubées en aérobiose à 30°C. L'ensemble du protocole d'isolement est illustré dans la (Figure 9).

4. Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement de la flore des bactéries lactiques et la flore des levures présentées dans notre échantillon se fait par le comptage des colonies après l'incubation après on applique la formule mathématique suivante (Guiraud et Rosec ; 2004) :

$$N = \frac{\text{Colonies}}{V_{ml} \times (n_1 + 0,1n_2) \times d_1}$$

$\sum c$ = Nombre totale des colonies comptées dans les boites dont le nombre de colonies est compris entre 15 et 300.

n_1 : nombre de boites de Pétri comptées de la 1ère dilution

n_2 : nombre de boites de Pétri comptées dans la seconde dilution.

d : facteur de dilution à partir duquel les 1er comptages ont été fait.

v : volumeensemencé

5. Purification et identification partielle des isolats

Les colonies sont sélectionnées selon leur aspect macroscopique et sont choisies aléatoirement. Elles sont ensuite purifiées par repiquage dans des milieux solides MRS et sabouraud pour les BL et les levures respectivement.

Pour l'identification présomptive des BL, des observations macroscopiques et microscopiques à l'état frais et après coloration de Gram, sont réalisées. Seules les cellules non mobiles, Gram positif, catalase négative et ayants des formes caractéristiques des BL (coques ou bacilles), sont retenues pour les analyses ultérieures (Paulo et al ; 2012).

Pour l'identification des levures, des observations macroscopiques et microscopiques à l'état frais et après coloration par le bleu de méthylène. Seules les grandes cellules non mobiles ayant des formes arrondies, sont retenues pour les analyses ultérieures.

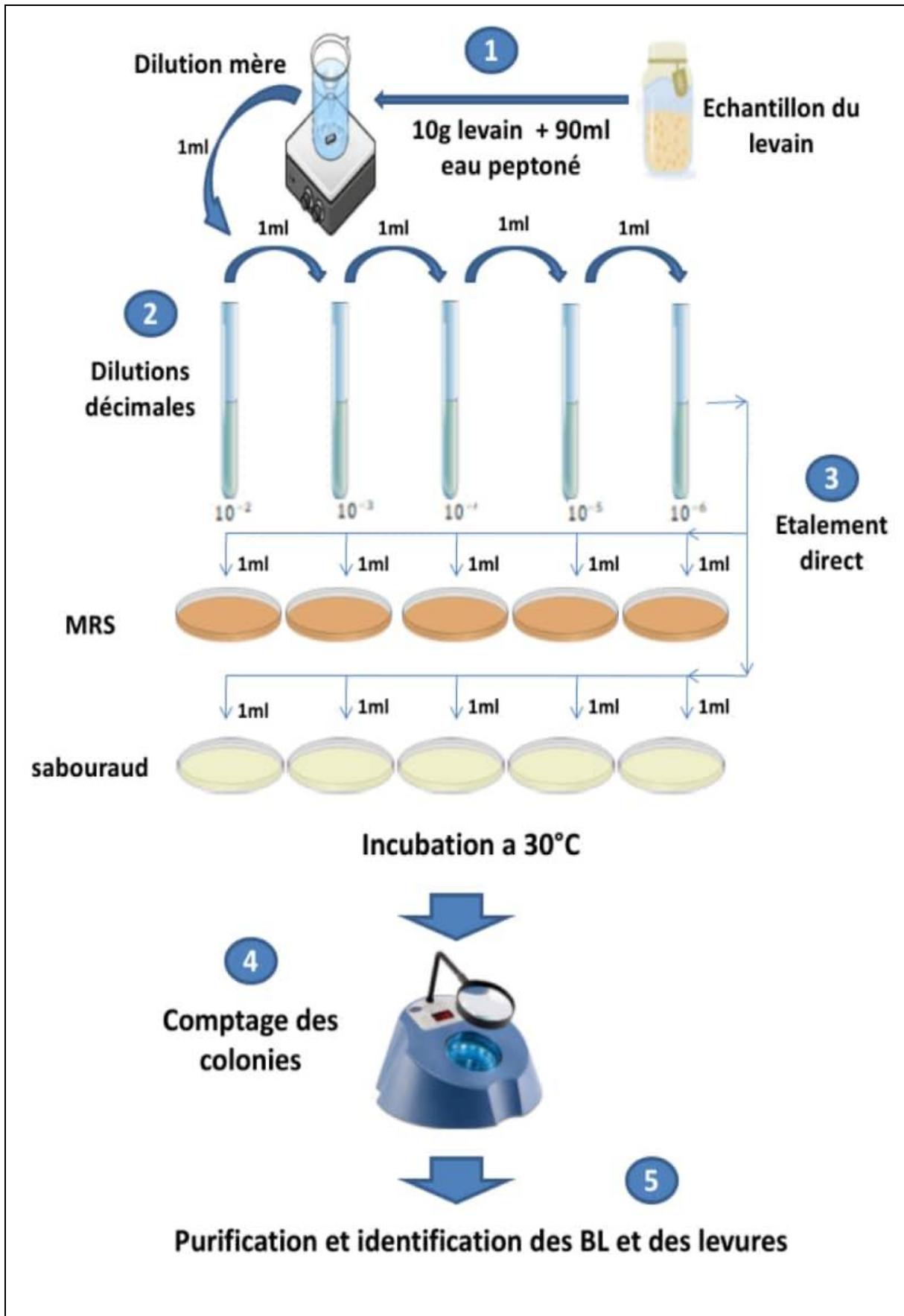


Figure 9 : protocole d'isolement des BL et des levures.

5.1. Les caractères morphologiques

5.1.1. Examen macroscopique

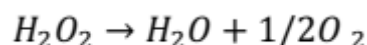
En se basant sur l'observation à l'œil nu pour déterminer l'aspect, la taille, la forme et la couleur des colonies des cultures bactériennes obtenues sur gélose MRS et sabouraud.

5.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique a été effectuée après coloration de Gram, à partir de culture bactérienne, elle permet de décrire la Gram des cellules(Annexe 2)., la forme et leur mode d'association

6. Test catalase

Le catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène qui se dégage (Annexe 2).



Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame puis à l'aide d'une pipette pasteur boullée puis déposer une colonie isolée de la souche à tester, ensuite observer l'apparition des bulles ou non (Delarras ; 2007).

II. Etude des propriétés technologiques

1. Criblage des isolats pour la production des exopolysaccharides

a) Pour les bactéries lactiques

Le criblage des isolats producteurs d'EPS a été effectué comme décrit par (Paulo et al ; 2012) avec quelques modifications. Des disques de papier filtre stérile (5 mm Ø) ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture MRSS additionné du saccharose 10 % et ont été inoculés avec 10 µl de culture de chaque isolat pour la production d'EPS (Paulo et al, 2012).Quatre isolats différents ont été testés dans chaque boîte de pétri avec le contrôle négatif (papier filtreensemencé avec 10µL de bouillon MRS stérile).

Les isolats ont été cultivés à 30°C pendant 48 heures, La teneur en dextrane était plus élevée à 30°C et surtout en présence de saccharose (Guérin et al ; 2020).

Après incubation de 48 à 72h à 30°C, la production d'EPS a été évaluée sur la base de la formation d'une colonie mucoïde autour des disques.

La production de ce bio-polymère par les isolats a été confirmée en mélangeant une portion de la substance mucoïde dans 2 ml d'alcool absolu dans des tubes à essai, l'apparition d'une précipité à l'interface révèle la présence des EPS (**Paulo et al ; 2012**).

La production d'EPS a été confirmée avec le test de la corde par toucher une anse d'inoculation stérile à des colonies individuelles. La formation d'une chaîne lors du soulèvement de la boucle a été considérée comme positive (**Franco et al.2020**). L'ensemble du protocole d'isolement est illustré dans la (**Figure 10**).

b) Pour les levures

Pour la mise en évidence de la production des EPS par les isolats sélectionnés de levures, des cultures actives de levures ont été striées sur des plaques de gélose YMA, Le milieu a été additionné de 2 % de saccharose. Les cultures pures ont été incubées à 25 °C pendant 2 à 7 jours. Les colonies présentant des surfaces visqueuses et un toucher filant avec une anse ont été signalées comme productrices d'EPS (**Franco et al ; 2020**). L'ensemble du protocole d'isolement est illustré dans la (**Figure 10**).

2. Etude du pouvoir amylolytique des isolats

a) Pour les BL

La dégradation de l'amidon a été étudiée par inoculation ponctuelle d'isolats actifs de BL (5 µl) sur des plaques contenant du milieu d'amidon MRS dans lequel le glucose a été remplacé par de l'amidon (1%) (Annexe 1). Les plaques inoculées ont été laissées croître à 30°C pendant 48H puis stocké à 4°C pendant 24H avant d'être inondé avec une solution d'iode (4%).La production d'amylase était indiquée par une zone claire autour des colonies, tandis que le reste de la plaque tachée de noir (**Ruiz Rodriguez et al ; 2016**).

b) Pour les levures

Pour identifier l'activité de l'amylase, une gélose nutritive (NA) a été utilisée (0,5 % de NaCl , 0,5 % de peptone, 0,2 % d'extrait de levure, 0,3 % d'extrait de viande, 1 % de glucose et 2 % d'agar) additionnée de 0,5 % d'amidon soluble et autoclavé pendant 20 min à 121°C .Après ensemencement des suspensions de levure , les échantillons ont été incubés pendant 96H à 28°C suivi d'une coloration avec une solution aqueuse d'iode pendant 5 min.

Après rejet de la solution, les levures productrices d'amylase ont été identifiées par la présence d'un halo clair autour d'elles, indiquant une dégradation de l'amidon (**Carvalho et al ; 2021**).

3. Etude du pouvoir protéolytique des isolats

a) Pour les BL

L'activité protéolytique a été recherchée dans un milieu gélosé PCA additionné de 2% de lait écrémé (Annexe 1) (Meghoufel et al ; 2019). Les souches bactériennes à tester ont été déposées (10 µl) dans des puits (réalisé avec des embouts stériles) du milieu gélosé.

L'incubation se fait à 30°C pendant 24 à 48 heures, l'activité protéolytique entraîne l'apparition d'un halo autour de touche (Meghoufel et al ; 2019).

b) Pour les levures

Pour identifier les levures productrices de protéases, le milieu NA (0,5 % de NaCl, 0,5 % de peptone, 0,2 % d'extrait de levure, 0,3 % d'extrait de viande, 1 % de glucose et 2 % d'agar) a été additionné de 2 % de lait écrémé (Annexe 1). Après ensemencement, les échantillons ont été incubés pendant 96H à 28°C. Pour l'identification, des zones claires ont été observées autour des levures protéolytiques (positives) (Carvalho et al ; 2021).

4. Etude de l'activité antimicrobienne

Les isolats lactiques sélectionnés, sont testés pour leur pouvoir antibactérien suivant la méthode de diffusion par des disques, décrite par Guiraud et Rosec ; (2004). Elle consiste à déposer des disques de papier filtre stérile imprégnés des souches lactiques en bouillon, à la surface des boîtes de Pétri préalablement inoculées par les souches bactériennes cibles. L'inhibition se manifeste par la présence de zones claires autour d'un trouble formé par la croissance des souches cibles.

4.1. Les souches bactériennes test

Des suspensions en eau physiologique stérile (0,9% de NaCl) de chaque souche test, sont préparées à partir d'une culture de 18 h à 30°C sur leurs milieux favorables (Chapman pour les *Staphylococcus aureus* et gélose nutritif pour *E.coli*). La concentration microbienne est ajustée à une valeur de 0,5 sur l'échelle de Mc Farland. Les micro-organismes tests sont ensemencés par écouvillons stériles sur le milieu Muller-Hinton(Annexe1).

4.2. Technique de diffusion sur disque

La gélose de Mueller Hinton (MH) est répartie dans les boîtes de pétri puisensemencée en surface, après solidification par la bactérie cible. Les boîtes sont laissées sécher pendant 5min, puis les disques filtres de 5mm de diamètre sont déposés aseptiquement, sur cette couche basale du milieu MH. Ces disques sont imprégnés de 10µL des cultures de bactéries lactiques à tester. Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h. La lecture de l'activité antimicrobienne se fait par la mesure du diamètre d'inhibition autour des disques, exprimée en mm (Guiraud et Rosec ; 2004).

5. Antagonisme des levures

L'inhibition de la croissance du mycélium des champignons par les levures a été étudiée par la technique de double culture avec une légère modification. Le PDA dans une boîte de Pétri a été strié linéairement avec une anse de cellules de levure actives (âgées de 2 jours) (9 cm de diamètre) à environ 2 cm de distance du bord de chaque plaque.

Ensuite, un disque fongique (5 mm de diamètre) de Champignon Ch Provenant d'une culture de PDA âgée de 5 jours a été localisé à une distance de 5 cm de la lignée de levure. Près d'un bord de la boîte. Une boîte de PDA inoculée avec seulement le mycélien de champignon sur un bord a été utilisée comme témoin négatif.

Des boîtes de Pétri ont été incubées à 28 ° C pendant 7 jours et ont été observées quotidiennement pour étudier la croissance mycélienne de Ch dans chaque boîte. L'inhibition de la croissance fongique a été déterminée comme le pourcentage de diminution du diamètre de la colonie par rapport au témoin. Le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des hyphes (R) a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$R(\%) = (R1-R2) / R1 \times 100\%$$

R est le pourcentage d'inhibition de la croissance radiale des hyphes, R1 est la croissance des hyphes du contrôle et R2 est la croissance des hyphes dans la boîte de Pétri inoculée avec des levures et/ou des isolats bactériens (**Kasfi et al ; 2018**).

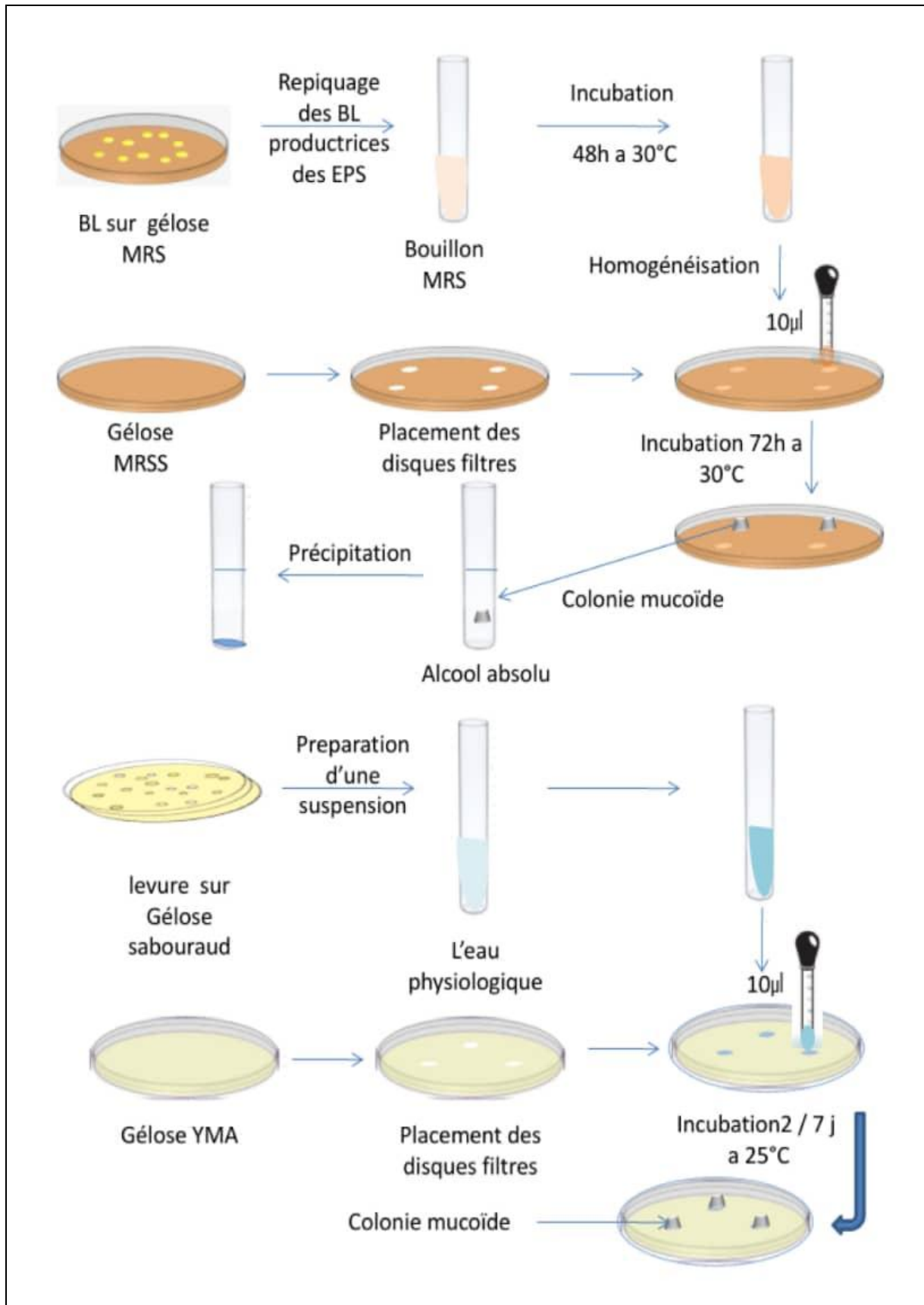


Figure 10 : protocole de criblage des BL et des levures productrices des EPS.

Résultats et discussion

1. Isolements et identifications des BL et des levures à partir du levain de blé

Lors de cette étude nous avons isolé dix – huit (18) souches des BL étiquetés de L1 jusqu'à L18 et six (6) souches des levures étiquetés S1-S6 à partir du levain de blé dur de la wilaya de kenchela.

Nos résultats sont en accord avec ceux de (Charlotte ; 2016) et (Celano et al ; 2018) qui ont montré la diversité de la microflore du levain par la présence des levures et des bactéries lactiques.

1.1. Les caractéristiques macroscopiques des isolats

La morphologie des isolats est un critère important pour leur identification dont les dimensions, le contour, la couleur, la viscosité, la pigmentation, l'opacité sont des caractères précieux qui permettent une première approche vers l'identification (Ghalouni ; 2019).

Cette examen après incubation, nous a permis de visualiser des colonies de taille petite, grande et moyenne, de forme circulaire avec une surface plate et parfois bombée à contours réguliers, de couleur blanchâtre, crème et présentant une texture crémeuse sur le milieu MRS pour les BL. Des grandes colonies brillantes de couleur blanchâtre pour les levures dans le milieu sabouraud. Le résultat de l'examen macroscopique est illustré dans la (Figure11).

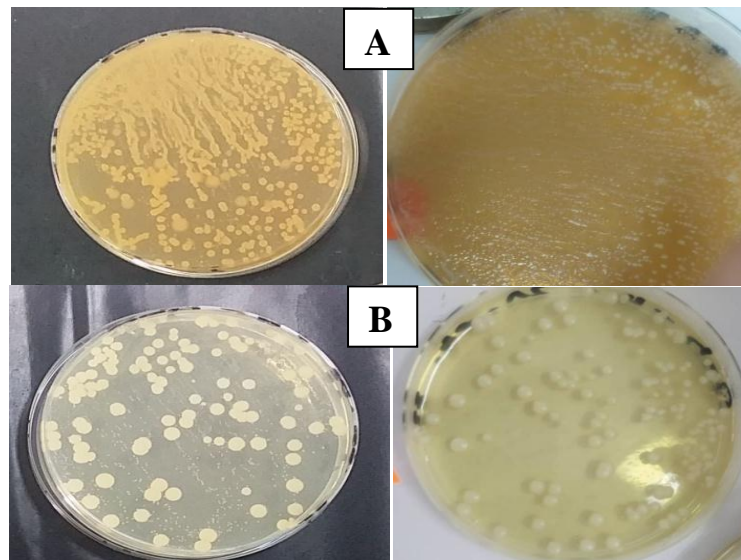


Figure 11 : Exemple des résultats d'isolement, (A) : des bactéries lactiques sur milieux MRS (B) : des levures sur milieu sabouraud, à partir d'échantillon de levain de blé dur.

1.2. Test de catalase

Le test de catalase a montré que toutes les souches isolées sont catalases négatives. L'absence d'un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse (**Figure 12**), traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Rodriguez et al ; 2016**).

Ce qui montre que ces dernières appartiennent probablement au groupe des bactéries lactiques. Les 20 souches sélectionnées ont été catalase négative (voir le **tableau 7**).



Figure 12 : Exemple de résultats de test de catalase.

1.3. Les caractères microscopiques

La coloration de Gram a montré que 12 isolats parmi les 18 sont de Gram positif (**Tableau 6**), et le test de catalase était négatif (**Figure 12**). Ces caractéristiques permettent de les considérer, de façons présomptives, comme BL (**Ruiz Rogriguez et al, 2016**). L'étude microscopique nous a permis de révéler la présence des cellules en forme de bacille ou cocci disposées en paire ou isolées, en chaînettes et par fois en amas (**Tableau 6**).


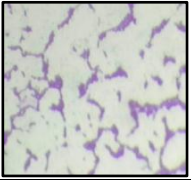
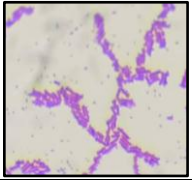
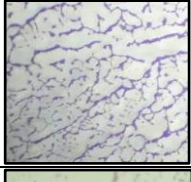
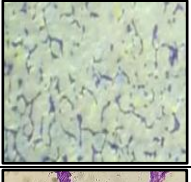
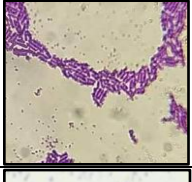
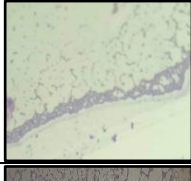

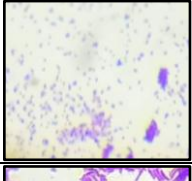
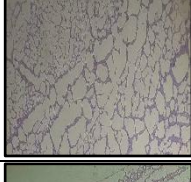
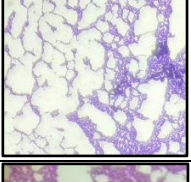
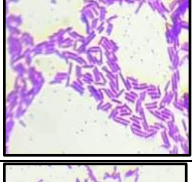
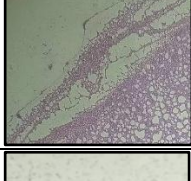
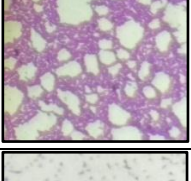
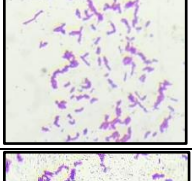
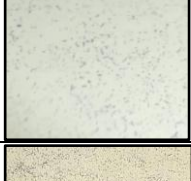
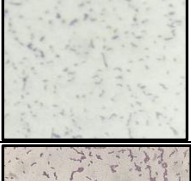
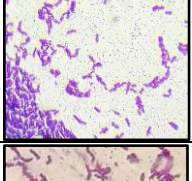

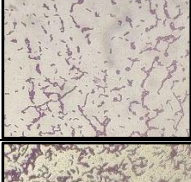
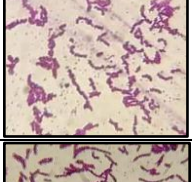

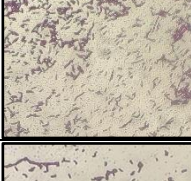
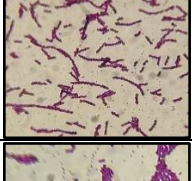

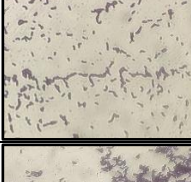
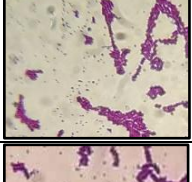

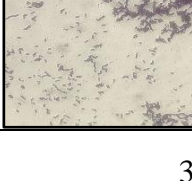

La coloration des isolats de levures par le bleu de méthylène a confirmé que les six isolats sont des levures immobiles ; forme sphérique et parfois bourgeonnées (**Tableau 7**).

1.4. Dénombrement

Après avoir réalisé plusieurs dilutions, on a pris en considération deux dilutions 10^{-4} et 10^{-5} dont le nombre de colonies est entre 30 et 300 des isolats bactériens et des levures.

A l'aide de la formule mathématique. On a trouvé un nombre levurien 1.32×10^8 UFC/g. Et un nombre bactérien 3.9×10^8 UFC/g de levain (la formule est démontrée dans la partie de matériel et méthodes).

Tableau 6: Caractéristiques microscopiques des 18 isolats du levain.

Les isolats des BL	Coloration de gram			Gram et La morphologie	Test catalase
	Grossissement ×10	Grossissement× 40	Grossissement ×100		
L1				Bacille à Gram -	-
L 2				Cocci à Gram +	-
L 3				Cocci à Gram +	-
L 4				Bacille à Gram +	-
L 5				Cocci à Gram -	-
L6				Cocci à Gram +	-
L 7				Cocci à Gram -	-
L 8				Cocci à Gram -	-
L 9				Cocci à Gram -	-
L 10				Cocci à Gram +	-




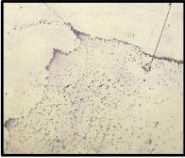
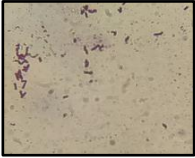
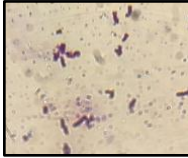
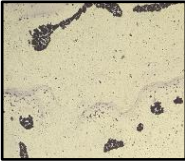
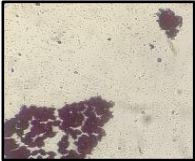
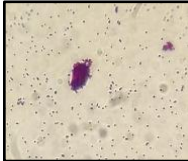

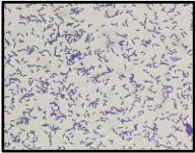




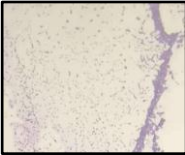
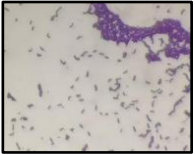
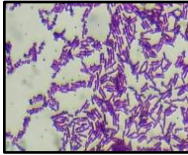
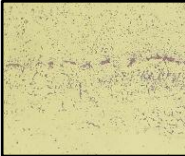

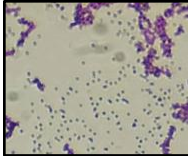
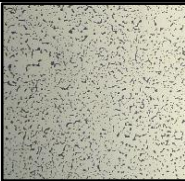


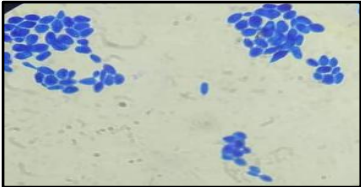
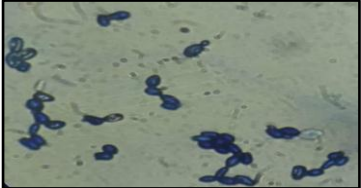
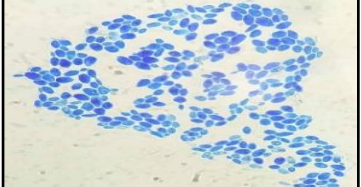

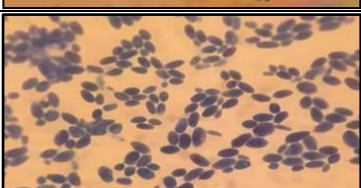
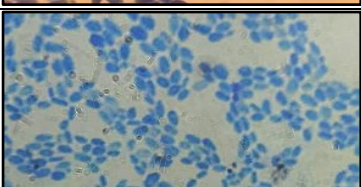
L 11				Bacille à Gram +	-
L 12				Cocci à Gram +	-
L 13				Cocci à Gram +	-
L 14				Bacille à Gram +	-
L 15				Cocci à Gram +	-
L 16				Bacille à Gram +	-
L 17				Cocci à Gram +	-
L 18				Cocci à Gram +	-

Tableau 7: Caractéristiques microscopiques des isolats des levures sélectionnés et purifiés.

Les isolats des levures	Coloration par le bleu de méthylène Grossissement $\times 100$	La morphologie
S 1		Ovoïde
S 2		
S 3		
S 4		
S 5		
S 6		

1.5. Purification des BL et des levures

Sur 18 isolats purifiés et examinés, on a sélectionné 12 à Gram positifs et à catalases négatives ont été retenues qui présumées comme bactéries lactiques étiquetés I1-I12.

Les isolats bactériens sont repiqués dans les milieux gélose MRS et bouillon MRS, les levures sont repiquées sur gélose sabouraud (**Figure 13**).

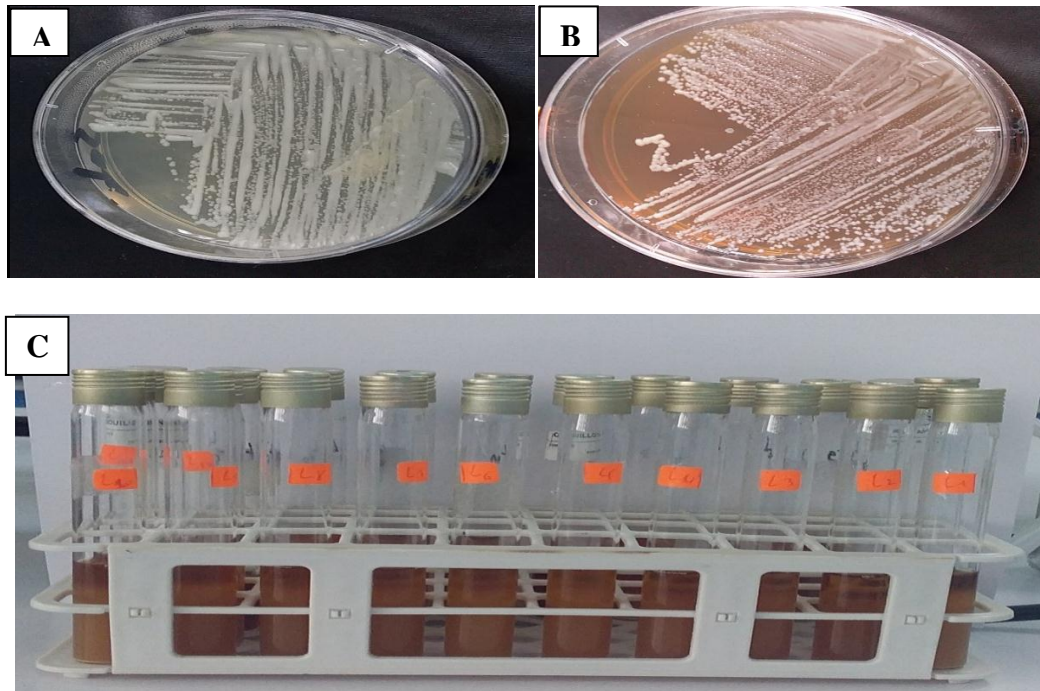


Figure 13: Exemple de repiquage des isolats ; (A) : levure sur sabouraut ; (B) : BL sur gélose MRS ; (C) : BL sur bouillon MRS.

2. Criblage des bactéries lactiques et des levures pour la production des exopolysaccharides

La production des EPS par les BL et les levures dans des milieux solide MRSS et YMA respectivement, est reconnue par la formation des colonies brillantes, bombées et visqueuses, on dit alors qu'elles ont un phénotype mucoïde. Ce dernier est caractérisé par la formation d'un long filament lorsqu'on touche et étire la colonie avec l'anse de platine qui présenter dans la (Figure 14) (Paulo *et al* ; 2012. Franco *et al* ; 2020).

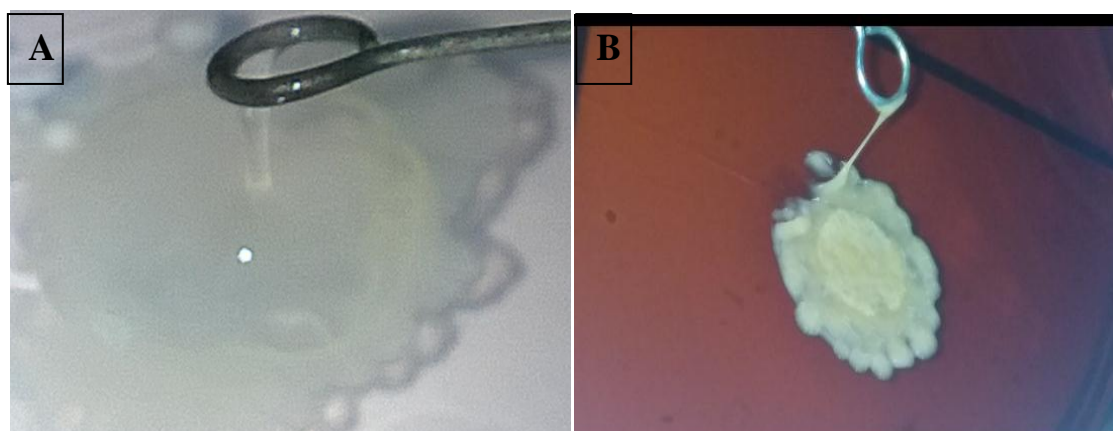


Figure 14 : filament formé au contact d'une anse de platine avec, (A) : une colonie de levure visqueuse et (B) : une colonie de bactérie mucoïde.

Les résultats présentés à la (**Figure 14**) montrent clairement la forme visqueuse et gluante des isolats de levures S1 ; S3 ; S4 dans le milieu YMA et la forme mucoïde pour l'isolat I5 des BL dans un milieu MRSS (**Tableau 8**). Ce qui confirme la production des EPS en présence du saccharose comme seule source de carbone. Des études menées par d'autres chercheurs signaler le saccharose était considéré la source de carbone la plus appropriée pour la production de EPS par les levures et les BL (**Gientka ; 2016**) (**Prete et al ; 2021**).

La production d'EPS varie d'une souche à l'autre. Ce pendant, la composition du milieu de croissance en termes de source de carbone et d'azote, ainsi que sur d'autres paramètres, notamment le pH du milieu de croissance, la température et la durée d'incubation.

Certains types de sucres sont meilleurs pour la production d'EPS car la production du polymère dépend de la souche testée et donc du métabolisme enzymatique de chaque souche (**Reale et al ; 2020**).

La production de polymères été confirmée, en mélangeant chaque colonie mucoïde dans l'éthanol d'une part et en mélangeant l'isolat de bactéries lactiques dans l'éthanol d'autre part (**Figure 15**). La formation d'un précipité et d'une suspension opaque respectivement, indiquent la présence d'EPS (**Paulo et al ; 2012**).

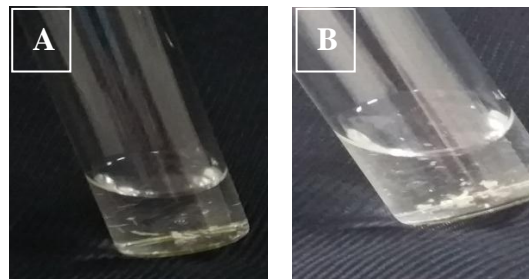


Figure 15: Confirmation de la production d'EPS, (A) : l'isolat de bactéries lactiques dans l'éthanol. (B) : précipitation des EPS dans l'éthanol.

Parmi Les souches productrices des EPS dans le levain décrite par (**Milanovic et al ; 2020**) *Leuconostoc citreum* et *Weissella confusa*. Elles ont la capacité de la production des de HePS et d'homopolysaccharides (HoPS).

Parmi les souches des levures productrices des EPS dans le milieu avec saccharose mentionné par (**Gientka ; 2016**) dans la microflore du levain est *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata* et *C. guilliermondii*. Les souches et produit des quantités similaires d'EPS. Ces dernier ont été identifiées dans tous les levains et predominates.

3. Etude du pouvoir protéolytique

L'activité protéolytique est importante pour la caractérisation technologique des bactéries lactiques et les levures car elle assure la capacité de croître efficacement dans le levain et les produits fermentés (Gänzle ; 2014 ; Chiva et al ; 2021).

Selon Meghoufel et al ; 2019 l'isolat est dite protéolytique s'il présente une zone de lyse (halo clair) entourant des puits sur la gélose PCA / NA additionnée 2% de lait écrémé présenté (Figure 16 et 17).

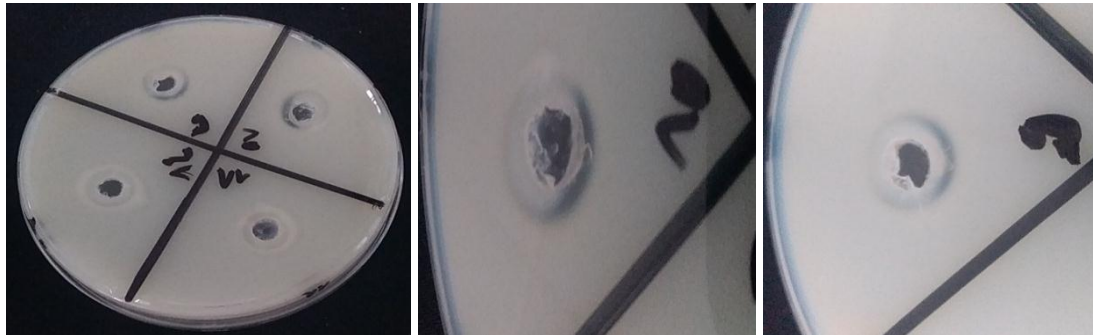


Figure 16: exemple de l'activité protéolytique des BL dans milieu PCA au lait.

D'autres travaux ont bien montré la présence des souches protéolytiques dans les aliments fermentés, les souches les plus performantes sont du genre *Lactococcus* et *Leuconostoc*. (Meghoufel et al ; 2019).

Des activités protéolytiques ont été détectées dans certains levains lorsque *S. cerevisiae* et *Kazachstania humilis* étaient les espèces dominantes. Ainsi, une augmentation du pool d'acides aminés libres a été détectée dans les pâtes lorsqu'une souche de *K. humilis* était utilisée comme levain. Généralement, cette fonctionnalité a été associée à certaines espèces des lactobacilles au levain (chiva et al ; 2021).

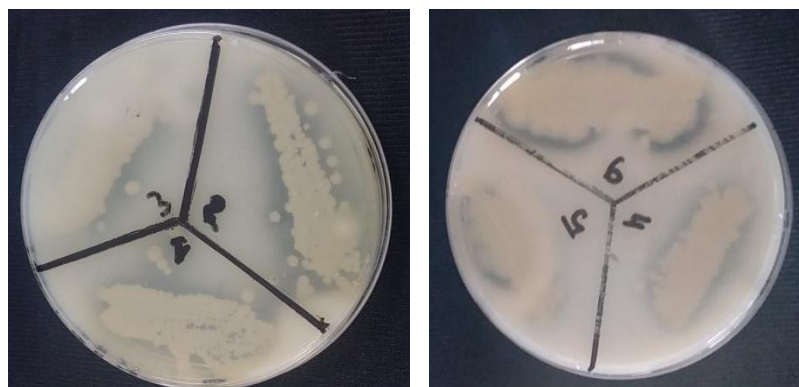


Figure 17: l'activité protéolytique des levures dans milieu NA au lait.

Les résultats de l'activité protéolytique des isolats après 48 heures d'incubation résumés dans le (Tableau 8 et 9). Indiquent que tous les isolats bactériens et de levures ont une bonne activité protéolytique appréciable et utile en industrie de la boulangerie.

4. Pouvoir amylolytique

Les BL amylolytiques sont très souvent isolées des céréales et participent à la production d'aliments fermentés depuis des siècles. La présence de zones claires autour des colonies (dégradation de l'amidon) indique une réaction positive pour l'hydrolyse de l'amidon (Penka etKaloyan ; 2020).

L'activité amylolytique des douze (12) isolats de bactéries lactiques montre la présence de zones claires autour des colonies appartenant à cinq isolats (Tableau 8) (I1 ; I2 ; I3 ; I11 ; I12) (Figure 18).

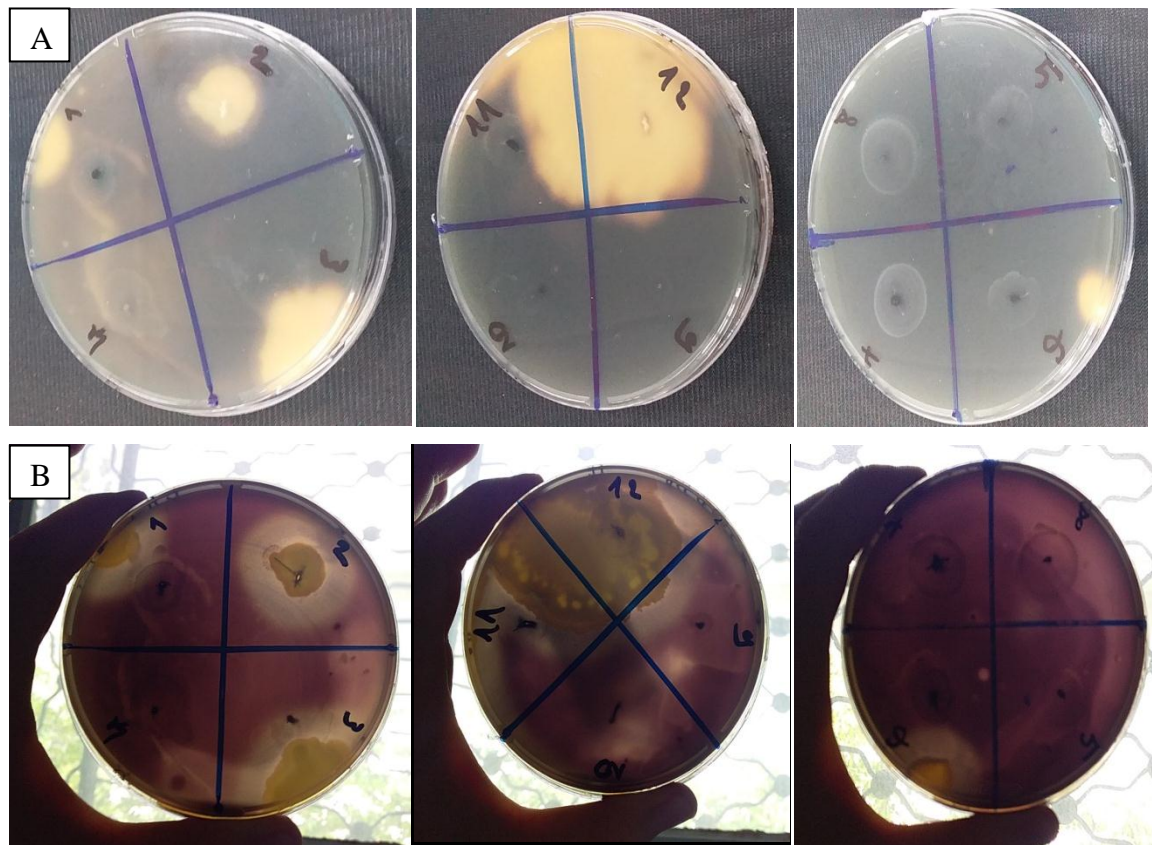


Figure 18: traitement des BL avec lugol dans milieu MRS additionné de l'amidon (A) : Avant la conservation 24H, (B) : après conservation 24H à 4°C.

D'après (Petrova et Kaloyan ; 2020), L'activité amylolytique est mise en évidence chez les isolats bactériennes rapprochés aux genres *Lactobacillus* et *Streptococcus* qui produisent de l'acide lactique directement à partir de l'amidon comme seule source de carbone.

Concernant les résultats de l'activité amylolytique des isolats des levures (Tableau 9), montrent l'absence totale d'un halo clair sur le pourtour des isolats (Figure 19).

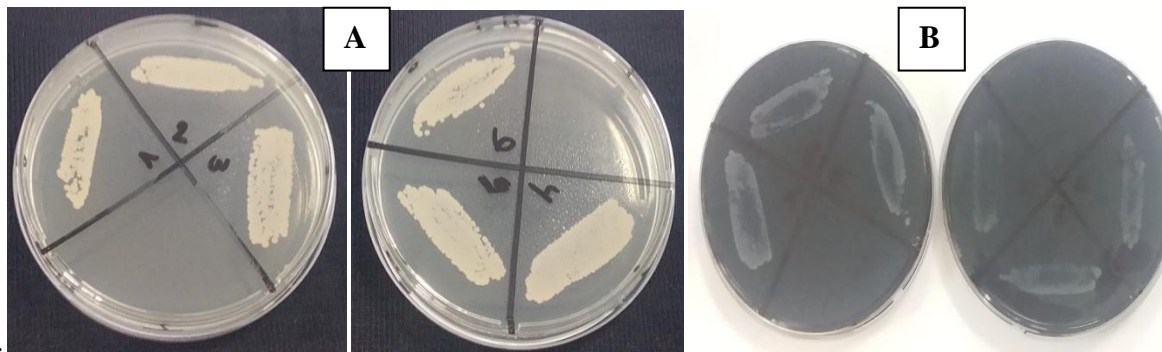


Figure 19 : l'activité amylolytique des levures dans milieu PDA additionné de l'amidon (A): avant l'ajout du lugol, (B): après l'ajout du lugol.

Les levures isolées sont bien poussées sur le milieu PDA avec l'amidon, mais sans dégradation de ce sucre, donc nos isolats des levures ne sont pas des amylolytiques. Par contre selon l'étude réalisé par (chiva et al ; 2021), ils ont montré que les levures ont un bon pouvoir amylolytique et *S. cerevisiae* l'une des souches abondante dans les levains.

Tableau 8 : Les résultats des activités amylolytiques et protéolytiques des bactéries lactiques et production des EPS.

Isolats	Activité amylolytique	Activité protéolytique (diamètres de lyse/ en (mm))	La production des EPS	
I 1	+	+	3.76	-
I 2	+	+	2.46	-
I 3	+	+	4.08	-
I 4	-	+	1.42	-
I 5	-	+	2.44	+
I 6	-	+	2.72	-
I 7	-	+	4.26	-
I 8	-	+	4.60	-
I 9	-	+	4.9	-
I 10	-	+	4.68	-
I 11	+	+	4.56	-
I 12	+	+	5.02	-

Tableau 9: Les résultats des activités amylolytiques et protéolytiques des levures et production des EPS.

Isolats	Activité amylolytique	Activité protéolytique	La production des EPS
S1	-	+	+
S2	-	+	-
S3	-	+	+
S4	-	+	+
S5	-	+	-
S6	-	+	-

5. Antagonisme des levures

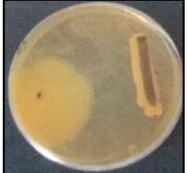


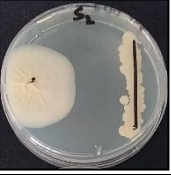


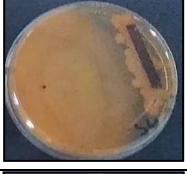





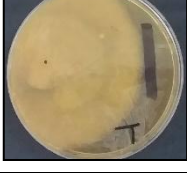

L'antagonisme entre chaque isolat de levure antagoniste et chaque champignon a été recherché par la technique de double culture telle que décrite ci-dessus.

Les résultats des expériences de double culture ont montré l'antagonisme chez 4 isolats testés : (S1 et S4) contre la moisissure 1 sur le milieu YPD ; (S2 et S4) contre la moisissure 2 sur le milieu PDA (Annexe1). Était capables d'inhiber significativement la croissance mycélienne dans les traitements de double culture. Formation des zones inhibitrices entre les colonies de levures et les moisissures a été observée après 7 jours d'incubation (**Tableau 10**).

Bien que la croissance mycélienne n'ait pas été inhibée par les isolats de levures (S2 ; S3 ; S5 ; S6 avec Ch 1) et (S1 ; S3 ; S5 ; S6 avec Ch 2) absence d'antagonisme (Tableau 11).

Nos résultats sont en accord avec ceux du (**Kasfi et al ; 2018**) qui ont constaté qu'il y a des interactions antagonistes entre des souches des levures et des champignons sont étudié par double culture. Ces interactions pourraient jouer un rôle clé dans le processus naturel de lutte biologique, bien que les mécanismes moléculaires impliqués soient encore largement connus. Sécrétion d'enzymes dégradant la paroi cellulaire, compétition pour les nutriments, prédation, production de mycotoxines sont des mécanismes possibles de lutte biologique.

Tableau 10 : Les résultats de l'activité antagoniste des levures contre les moisissures Ch1, Ch2.

Isolats	Résultats de la croissance de moisissure Ch1	Valeurs d'inhibition de la croissance (R%) de moisissure Ch1	Résultats de la croissance de la moisissure Ch2	Valeurs d'inhibition de la croissance (R%) de moisissure Ch2
	milieu de culture YPD		milieu de culture PDA	
S1		30%		Absence d'inhibition
S2		Absence d'inhibition		50%
S3		14%		Absence d'inhibition
S4		Absence d'inhibition		54%
S5		Absence d'inhibition		Absence d'inhibition
S6		Absence d'inhibition		Absence d'inhibition
Témoin		/		/

6. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques

La capacité de compétition des bactéries lactiques résulte de leur activité fermentaire associée à la production des divers composés antimicrobiens dans le but d'inhiber la prolifération des microorganismes. Des nombreuses substances à activité antagoniste produites par les bactéries lactiques ont régulièrement été mises en évidence (Benyoucef ; 2018).

Dans notre étude l'inhibition observée contre les souches pathogène est négative (Figure 20). Ces résultats ne sont pas en accord avec les travaux de nombreux auteurs, ayant décrit le pouvoir antimicrobien exercé par nombreuses BL isolées de produits laitiers et autres matrices alimentaires (Mami ; 2013 ; Bouzaid *et al* ; 2016).

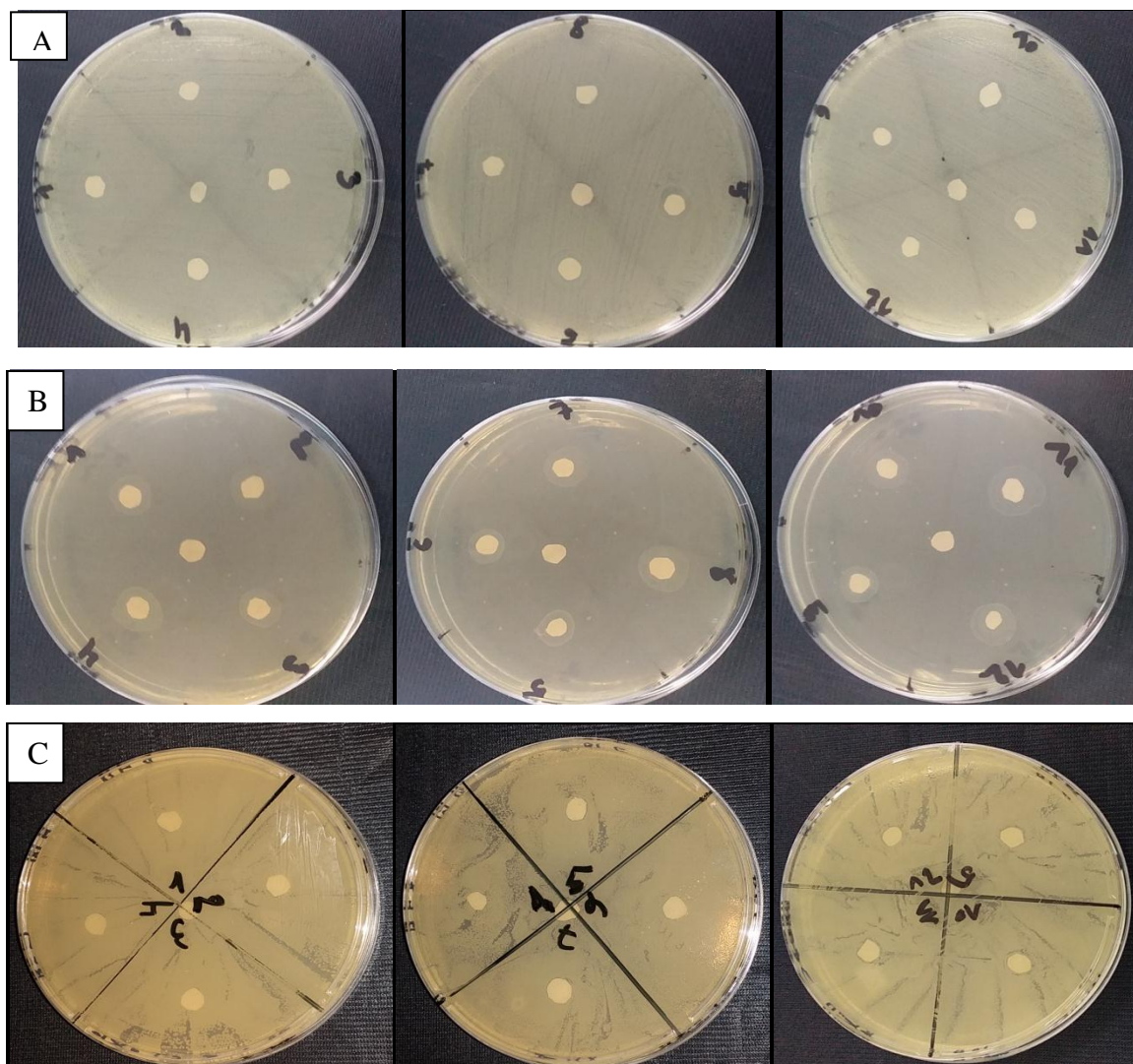


Figure 20: l'activité antimicrobienne des isolats des bactéries lactiques contre (A): *Staphylococcus aureus* ; (B) : *Pseudomonas sp.* (C) : *E. coli*.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que, les BL sélectionnées ne possèdent pas une forte activité antimicrobienne contre les souches testées ou ces dernières sont résistantes (Tableau 11).

Tableau 11 : Les résultats de l'activité antimicrobienne des bactéries lactiques contre des souches pathogènes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas sp*)

Isolats	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
I 1	-	-	-
I 2	-	-	-
I 3	-	-	-
I 4	-	-	-
I 5	-	-	-
I 6	-	-	-
I 7	-	-	-
I 8	-	-	-
I 9	-	-	-
I 10	-	-	-
I 11	-	-	-
I 12	-	-	-

Conclusion générale et perspectives

Les bactéries lactiques et les levures sont utilisées empiriquement depuis des siècles dans la fabrication de nombreux aliments fermentés. Elles ont un intérêt industriel tout particulier, où elles sont utilisées pour améliorer les caractères organoleptiques de différents produits alimentaires (le goût, la saveur, la texture, l'arome de produits par exemple le pain, le lait fermenté, le yaourt, le fromage, et les produits carnes...etc.).

Au terme de ce travail, ce mémoire nous a permis d'avoir une idée sur la composition de la flore microbiologique en bactéries lactique et en levure d'un levain traditionnel du blé de la wilaya de kenchela. Ce produit montre diversité des isolats qui dépend de sa région.

Les propriétés technologiques des isolats de bactéries lactiques et des levures ont été réalisées par la détermination des caractéristiques métaboliques représentées par la production des EPS, quelques activités enzymatiques (protéolytique et amylolytique) et l'antagonisme contre quelques souches pathogènes.

Les isolats obtenus ont une très bonne activité protéolytique. Quelques isolats des BL capables de dégrader l'amidon et pour les levures, aucune activité détectable n'a été observée.

Pour l'activité antimicrobienne, certains isolats de levure pourvu une activité positive contre les deux de moisissures testées. Mais aucun effet inhibiteur vis à vis de BL n'est retrouvé contre l'ensemble de souches pathogènes testés (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas sp*).

Les tests de l'isolement et de l'identification aux quels l'ensemble des souches isolées étaient soumises ont permis de cribler 12 isolats lactiques et 06 de levure, avec 01 isolat et 03 respectivement possédant le pouvoir de produire des EPS.

En conclusion, on peut dire que le levain contient des bactéries lactiques et des levures dotés des propriétés technologiques très intéressantes et on pourrait sélectionner quelques isolats que ce soit des BL ou de levures pour faire un starters pour les utiliser dans le domaine agroalimentaire.

L'ensemble des résultats obtenus nous ouvrent aux perspectives suivantes :

- l'identification moléculaire des isolats ayant manifestés la production des EPS et la confirmation de la production d'EPS par des dosages spectrophotométriques.
- la détermination de la structure des EPS sécrétés et la caractérisation de leurs propriétés.
- Réalisation de challenge test pour examiner l'efficacité des starters obtenus.

Les bactéries lactiques et les levures rentrent dans de nombreux processus de fermentation des aliments et dans la nutrition humaine, car elles contribuent positivement à la santé humaine et elles ont la propriété de produire des composant d'intérêt comme les exopolysaccharides, des enzymes et des agents antimicrobiens qui peuvent être utilisés en industrie alimentaire.

La présente étude a pour but d'isoler des bactéries lactiques à partir d'échantillons de levain traditionnel et d'élaborer à partir de blé dur obtenus de la wilaya de Khenchela, ainsi que la mise en évidence de leur aptitude à produire des EPS et des protéases intitulé dans l'étude suivante : ***Recherche et criblage de bactéries lactiques et de levures d'intérêt technologique isolées à partir de levain traditionnel.***

Sur la base des critères macroscopiques, microscopiques et biochimiques, six isolats de levures et 12 isolats de BL ont été sélectionné parmi les 18 isolats, partiellement caractérisées. Le criblage a permis de sélectionner un isolat de BL producteur d'EPS parmi les 12 isolées et 3 isolats de levure. La recherche de la production d'EPS a été menée sur un milieu MRS supplémenté de saccharose à 10%.La précipitation à l'éthanol a permis une confirmation de la production d'EPS. Concernant la production des protéases et de l'amylase, tous les isolats des levures et des bactéries ont une bonne activité protéolytique. Contrairement l'activité amylolytique qui est apparue dans quelques isolats bactériens I1 ; I2 ; I3 ; I11 ; I12.

Les isolats de levures et de bactéries ont été également testés afin d'évaluer leurs aptitudes technologiques, notamment, le pouvoir protéolytiques ; amylolytique et leurs capacité antagoniste. Les BL ont été testé contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli*, mais sans succès. Le test contre deux souches de moisissures des isolats de levures a montré que la souche S2 et S4 possédant une activité antifongique.

En conclusion, on peut dire que le levain contient des bactéries lactiques et des levures dotées des propriétés technologiques très intéressantes et on pourrais sélectionner quelques isolats que ce soit des BL ou de levures pour faire un starters pour les utiliser dans le domaine agroalimentaire.

Mots clés: levain, bactéries lactiques, levures, exopolysaccharides, protéase.

Lactic acid bacteria and yeasts are involved in many food fermentation processes and in human nutrition, as they contribute positively to human health and have the property of producing components of interest such as exopolysaccharides, enzymes and antimicrobial agents that can be used in the food industry.

The purpose of this study is to isolate lactic acid bacteria from samples of traditional sourdough and to make from durum wheat obtained from Khenchela wilaya, as well as the demonstration of their ability to produce EPS and proteases entitled in the following study: Research and screening of lactic acid bacteria and yeasts of technological interest isolated from traditional sourdough.

Based on macroscopic, microscopic and biochemical criteria, six yeast isolates and 12 LAB isolates were selected from the 18 partially characterized isolates. Screening was used to select one PSE-producing LAB isolate from the 12 isolates and 3 yeast isolates. Research into the production of PSE was carried out on a MRS medium supplemented with 10% sucrose. Ethanol precipitation confirmed the production of PSE. Concerning the production of protease and amylase. All yeast and bacteria isolates have good proteolytic activity. Unlike amylolytic activity, this appeared in a few bacterial isolates I1 ; I2 ; I3 ; I11 ; I12.

Yeast and bacterial isolates were also tested to assess their technological abilities, including proteolytic; amylolytic and antagonistic properties. LAB were tested against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli*, but without success. The test against two mold strains of yeast isolates showed that strain S2; S4 having antifungal activity.

We can say that sourdough contains lactic bacteria and yeasts with very interesting technological properties and we could select a few isolates (LAB or yeasts) to make a starter for use in food industry.

Keywords: lactic acid bacteria; yeast; sourdough; exopolysaccharide; protease.

تشارك البكتيريا و الخمائر في العديد من عمليات التخمر الغذائي في غذاء الإنسان, حيث تساهم بشكل إيجابي في صحة الإنسان . كونها تملك خاصية إنتاج مكونات ذات أهمية مثل السكريات الخارجية , الإنزيمات و العوامل المضادة للميكروبات التي يمكننا استخدامها في صناعة الأغذية.

الغرض من هذه الدراسة هو عزل البكتيريا اللاكتيكية و الخميرة من عينة العجينة المخمرة التقليدية المصنوعة من القمح الصلب الذي تم الحصول عليه من ولاية خنشلة. بالإضافة إلى إثبات قدرتها على إنتاج السكريات الخارجية و البروتياز. تنحصر هذه الدراسة تحت عنوان : بحث و فحص البكتيريا اللاكتيكية و الخمائر ذات الأهمية التكنولوجية المعزولة من العجين المخمر التقليدي.

بناء على المعايير العيانية و المجهرية و الكيمائية الحيوية، تم اختيار ستنة عزل للخميرة و إثنة عشر عزلة بكتيرية من أصل ثمانية عشر عزلة. مكنتنا هذه الدراسة من عزل نوع بكتيري واحد قادر على إنتاج السكريات الخارجية من أصل إثنا عشر عزلة و ثلاثة عزل من الخميرة من أصل ستة. تم استعمال وسط MRS غني بالسكروز (10%) من أجل تعيين العزل المنتجة للسكريات الخارجية كما تم تأكيد وجود هذه المركبات باختبار الإيثانول. في ما يخص إنتاج البروتياز و الأميلاز، تعتبر كل عزلات البكتيريا و الخميرة المتحصل عليها ذات نشاط بروتياز إيجابي ، بعكس إنتاج الأميلاز الذي وجد فقط عند أقلية من العزلات البكتيرية I1 ; I2 ; I3 ; I11 ; I12 .

كما تم اختبار و تقييم الجانب التكنولوجي للعزلات، بما في ذلك التحليل قدراتها على إنتاج عدة مركبات إنزيمية . إضافة إلى اختبار إنتاج العزلات البكتيرية لمركبات مضادة للبكتيريات الذي أجري ضد عدة أنواع بكتيرية : (*Staphylococcus aureus* . *Escherichia coli* . *Pseudomonas sp*) ولكن دون نجاح. بينما أظهرت نتائج إختبار عزلات الخميرة ضد نوعين من الفطريات و وجود نشاط لكل من العزل S1 ; S3 ضد النوع الأول و S2 ; S3 ضد النوع الثاني للفطريات.

في الختام، يمكننا القول أن العجين المخمر يحتوي على عدة بكتيريا و خمائر لبنية ذات خصائص تكنولوجية مهمة و يمكننا اختيار عدد قليل من هذه العزلات، سواء بكتيريا أو خميرة لصنع مقبلات لاستخدامها في صناعة المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا اللاكتيكية ، الخميرة ، العجينة المخمرة، السكريات الخارجية، البروتياز.

Références bibliographiques

1. **Abriouel, H, Benomar, N, Cobo, A, Caballero, N, Fuentes, M. Á. F, Pérez-Pulido, R, Gálvez, A. (2012).** Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food microbiology*, 32(2), 308-316.
2. **Arora, K, Ameer, H, Polo, A, Di Cagno, R, Rizzello, C. G, Gobbetti, M. (2021).** Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 71-83.
3. **Aslankoochi, E, Herrera-Malaver, B, Rezaei, M. N, Steensels, J, Courtin, C. M, Verstrepen, K. J. (2016).** Non-conventional yeast strains increase the aroma complexity of bread. *PLoS One*, 11(10), e0165126.
4. **Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., & Ouzrout, R. (2005).** CARACTERISATION PHENOTYPIQUE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES A PARTIR DE LAIT CRU DE CHEVRE DE DEUX POPULATIONS CAPRINES LOCALES " ARABIA ET KABYLE". *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 30-37.
5. **Bekhouche, F (2006).** Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et Identification biochimique. 2. Evaluation et optimisation de la production de l'enzyme polygalacturonase. (Thèse de doctorat, Université abbeslaghrour de kenchela).
6. **Belarbi, F. (2011).** Isolement et sélection des souches de bactéries lactiques productrices des métabolites antibactériens. (Doctoral dissertation, Université d'Oran 1-Ahmed Ben Bella).
7. **Benyoucef, A. (2018).** Etude des propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques produisant des substances antimicrobiennes. Thèse de doctorat. Oran: Université Oran 1 Ahmed Ben Bella.
8. **Bouzaid, M, Chatouri, R, L'attache, R, Hasib, A, (2016).** Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (Maroc). *Microbial. Ind. San et Environn*, 10(1) :1-12.
9. **Carvalho, J. K, Panatta, A. A. S, Silveira, M. A. D, Tav, C, Johann, S, Rodrigues, M. L. F, Martins, C. V. B. (2021).** Yeasts isolated from a lotic continental

- environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. *Biotechnology Reports*, 30, e00630.
10. **Celano, G, De Angelis, M, Minervini, F, Gobbetti, M. (2016).**Different flour microbial communities drive to sourdoughs characterized by diverse bacterial strains and free amino acid profiles. *Frontiers in microbiology*, 7, 1770.
 11. **Chiva, R, Celador-Lera, L, Uña, J.A, Jiménez-López, A, Espinosa-Alcantud, M, Mateos-Horganero, E, Vega, S, Santos, M.Á, Velázquez, E, Tamame, M (2021).**Yeast Biodiversity in Fermented Doughs and Raw Cereal Matrices and the Study of Technological Traits of Selected Strains Isolated in Spain. *Microorganisms*, 9, 47.
 12. **De Vuyst, L, Neysens, P. (2005).**The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 43-56.
 13. **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. *France. LA VOISIER*.
 14. **Dominika, J, Susana C, R, Celia CG, S. (2020).**Exopolysaccharides produits par les bactéries lactiques : à partir de La biosynthèse aux propriétés bénéfiques pour la santé. *Nourriture*, 11(156), 23.
 15. **Drider, D., Prévost., H. (2014).** *Les bactéries lactiques*. Economica. Paris.
 16. **Faria-Oliveira, F, Puga, S, Ferreira, C. (2013).** Yeast: world's finest chef. In *Food Industry*. IntechOpen.
 17. **Franco, W, Pérez-Díaz, I. M, Connelly, L, Diaz, J. T. (2020).**Isolation of exopolysaccharide-producing yeast and lactic acid bacteria from quinoa (*Chenopodium quinoa*) sourdough fermentation. *Foods*, 9(3), 337.
 18. **Gänzle, M. G. (2014).** Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 37, 2-10.
 19. **Ghalouni, E, Karam, O. H. N. E. (2018).** Phenotypic Identification and Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from L'ben, An Algerian Traditional Fermented Cow Milk. *Journal of PurE and aPPLiEdMicrobiology*, 12(2), 521-532.
 20. **Gientka, I, Bzducha-Wróbel, A, Stasiak-Róžańska, L, Bednarska, A. A, Błażej, S. (2016).** The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 31-37.

21. **Guérin Marie, Christine, G, Fabienne, R. (2020).** Production de bactéries lactiques Exopolysaccharides de Fruits et Légumes et Avantages associés. *Fermentation*, 6 (115), 21.
22. **Guetarni ,H. (2013).** Effets antibactériens des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus Algériens sur la croissance de *Helicobacterpylori* .(these de doctorat,Université d'Oran Es-Sénia).
23. **Guiraud, J. P, Rosec , J. P (2004).***Pratique des normes en microbiologie alimentaire .France. Afnor,237-243.*
24. **Kasfi, K, Taheri, P, Jafarpour, B,Tarighi, S. (2018).**Identification of epiphytic yeasts and bacteria with potential for biocontrol of grey mold disease on table grapes caused by *Botrytis cinerea*. *Spanish journal of agricultural research*, 16(1), 23.
25. **Khunnamwong,P , Lertwattanasakul , N, Jindamorakot,S, Suwannarach, N, Matsui, K , Limtong, S.(2020).** Evaluation de l'activité et des mécanismes antagonistes des levures endophytes vis-à-vis des champignons pathogènes responsables de maladies économiques des cultures.*FoliaMicrobiologica*,65, 573–590.
26. **Kihal, M. (2013).** *Evolution de l'activité antimicrobienne des isolats de bactéries lactiques et détermination du spectre d'action de leurs biopeptides vis-à-vis des germes d'altération* (Doctoral dissertation, Université de Mascara).
27. **Lammi, S. (2011).** Recherche de substances à activités antimicrobiennes (antibactériennes et anticandidoses) produites par des souches levuriennes isolées des sols sahariens. (Thèse de doctorat, UniversitéMentouri de Constantine)
28. **Li,L, Han,NS, (2018).** Application of lactic acid bacteria for food biotechnology. *Emerging aneas in bioengineering*. 2, 375-398.
29. **Mami,A, (2013).** Recherche des bactéries lactiques productrices de bactériocies à large spectre d'action viv-à-vis des germes impliqués dans les toxi-infections alimenyaires en algérie.(Thèse de doctorat,Université d'Oran)
30. **Maria I, T, Graciela, F. Fernanda, .M. (2015).**Biopolymères issus de bactéries lactiques. Nouvelles applications dans les aliments et les boissons. *Frontiers in microbiology*, 6(834),16.
31. **Mechai, A. (2009).** *Isolement, caractérisation et purification de bactériocines produites par des bactéries lactiques autochtones: études physiologiques et*

- biochimiques* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba).
32. **Meghoufel, N, Benkrizi, N, Dahloum, L, Benotmane, K, Homrani, A.E.K. (2019)**. Etude des interactions au sein d'une communauté composée de bactéries lactiques du genre *Lactococcus* et *Leuconostoc*. *Sciences de la Nature et de la Vie*, 6, 7.
33. **Merabti, R. (2006)**. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de sol saharien algérien. (Mémoire de magister, Université Mentouri de Constantine)
34. **Milanović, V, Osimani, A, Garofalo, C, Belleggia, L, Maoloni, A, Cardinali, F, & Clementi, F, (2020)**. Selection of cereal-sourced lactic acid bacteria as candidate starters for the baking industry. *PLoS One*, 15(7), e0236190.
35. **Minervini, F, De Angelis, M, Di Cagno, R, Gobbetti, M. (2014)**. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International journal of food microbiology*, 171, 136-146.
36. **Mora-Villalobos, J. A, Montero-Zamora, J, Barboza, N, Rojas-Garbanzo, C, Usaga, J, Redondo-Solano, M, ...López-Gómez, J. P. (2020)**. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: a review. *Fermentation*, 6(1), 23.
37. **NADIA, Berber. (2017)**. Caractérisation biomoléculaire et biotechnologique des souches de *Saccharomyces cerevisiae* issues des cépages Algériens. (Doctoral dissertation, Université Abdelhamid Ibn Badis).
38. **Nguyen, T. D. (2016)**. *Protection de la levure Saccharomyces cerevisiae par un système biopolymérique multicouche: effet sur son activité métabolique en réponse aux conditions de l'environnement* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).
39. **Nuobariene, L, Cizeikiene, D, Gradzeviciute, E, Hansen, Å. S, Rasmussen, S. K, Juodeikiene, G, Vogensen, F. K. (2015)**. Phytase-active lactic acid bacteria from sourdoughs: Isolation and identification. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 766-772.
40. **Paulo, E, M, Vasconcelos, M, P, Oliveira, I, S, Affe, H, M, D, J, Nascimento, R., Melo, I, S, D, et Assis, S, A, D, (2012)**. An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation. *Food Science and Technology*, 32(4):710-714.

41. **Penka, P, Kaloyan, P. (2020).** Fermentation lactique des céréales et Pseudo céréales ÿ: des biotechnologies nutritionnelles anciennes aux applications modernes, *Nutriments*, 12 (1118), 26.
42. **Phu-Tho, N, Tho-Thi, N, Duc-Cuong, B, Phuoc-Toan, H, Quoc-Khanh, H, .Huu-Thanh, N. (2020).** Production d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques: la manipulation des contraintes environnementales pour les applications industrielles, *AIMS Microbiology*, 6(4), 469–451.
43. **Prete, R, Alam, M. K, Perpetuini, G, Perla, C, Pittia, P, Corsetti, A. (2021).** Lactic acid bacteria exopolysaccharides producers: A sustainable tool for functional foods. *Foods*, 10(7), 1653.
44. **Reale, A, Zotta, T, Ianniello, R. G, Mamone, G, Di Renzo, T. (2020).** Selection criteria of lactic acid bacteria to be used as starter for sweet and salty leavened baked products. *LWT*, 133, 110092.
45. **Rezki-Bekki, M. A. (2014).** *Production de metabolites par les levures: caractérisation et identification des arômes et des alcools* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université d'Oran. Algérie).
46. **Roudj, S. (2011).** Proteolyse chez lactobacillus : purification et caractérisation de proteases et des aminopeptidases. (Thèse de doctorat, Université d'Oran)
47. **Roussel, P., Onno, B., Michel, E., & Sicard, D. (2020).** *La panification au levain naturel* (p. 100). éditions Quae.
48. **Ruiz Rodríguez, L, Vera Pingitore, E, Rollan, G, Cocconcelli, P. S, Fontana, C, Saavedra, L, Hebert, E. M. (2016).** Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1289-1301.
49. **Sadi, F, Bouras, A. D, Ghomari, F. N, Hallouz, F, & Noui, A. (2017).** Phenotypic, molecular and technological characterization of autochthonous lactobacilli strains isolated from cow's milk and goat of Algerian populations. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(1), 339-353.
50. **Sanalibaba, P, Çakmak, G. A. (2016).** Exopolysaccharides production by lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Open Access*, 2(115), 10-4172.

51. **Sawadogo-Lingani, H. (2010).** La fermentation lactique dans le procédé traditionnel de fabrication de la bière de sorgho (dolo, pito): caractérisation des bactéries lactiques pour la sélection de cultures starter.(Thèse de doctorat, Université de Ouagadougou)
52. **Tahlaiti, H. (2019).** *Etude des propriétés technologiques et inhibitrices de bactéries lactiques isolées à partir de blèfermentè* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).
53. **Urien, C. (2015).** *Diversité des espèces de levures dans des levains naturels français produits à partir de farine issue de l'Agriculture Biologique: une étude pilote pour analyser les pratiques boulangères et les patterns des communautés microbiennes* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).
54. **Waters, D. M, Mauch, A, Coffey, A, Arendt, E. K, Zannini, E. (2015).** Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal-based beverages: a review. *CriticalReviews in Food Science and Nutrition*, 55(4), 503-520.
55. **Zidani, H,(2015).** Les exopolysaccharides des bactéries lactiques : optimisation et cinétique de production.(Mémoire de magister, Université d'Oran Ahmed Ben Bella).

ANNEXE

Annexe 1 : Les milieux de cultures utilisés :

- **Gélose PDA (Potato Dextrose Agar) :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Infusion de pomme de terre.....	200g
Dextrose	20g
Agar.....	17g

(pH 5,6 ±0,2 à 25°C)

Méthode de préparation :

Suspendre 42.0 g dans 1 litre de l'eau distillée. Chauffer jusqu'à la dissolution totales.

Autoclaver à 121°C pendant 15minutes.

- **Gélose MRS (deMan, Rogosa, Sharpe) :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Dextrose	20g
Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Extrait de viande	8g
Sulfate de magnésium	0,20g
Extrait de levure	4g
Sulfate de manganèse	0,05g
Glucose	20g
Phosphate dipotassium	2g
Polysorbate 80	1g
Agar	10g
Citrate d'ammonium	2g

(pH final à 25°C : 6.5 ± 0,2)

Méthode de préparation:

Suspendre 62.0 g dans 1 litre de l'eau distillée. Agiter bien et chauffer une minute jusqu'à la dissolution totales. Autoclaver à 121°C pendant 12 minutes.

- **Gélose PCA (Plate Count Agar):**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de caséine	5g
Extrait de levure	2, 50g

Glucose	1g
Agar	15g

(pH final à 25°C: 7,00 ± 0,2)

Méthode de préparation :

Mettre en suspension 23 grammes dans 1 litre d'eau pure .porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

- **Gélose PCA additionnés de lait écrémé :**

Pour préparer le milieu gélose PCA avec le lait écrémé il faut mélanger 800 ml de milieu PCA gélosé liquide avec 200 ml de lait écrémé.

- **Gélose Mueller-Hinton :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée.

Peptone	17,50g
Extrait de viande	2g
Amidon	1,50g
Agar	17g

(pH final 7,3± 0,2 à 25°C)

Méthode de préparation :

Dissoudre 38grammes dans 1 litre d'eau purifiée. Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir 1 minute pour complètement la suspension. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

- **Milieu Sabouraud Glucosée ou SDA (Sabouraud Dextrose Agar):**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone de caséine	5g
Peptone de viande	5g
Glucose monohydraté	40g
Agar	15g

(pH final à 25°C : 5,6± 0,2)

Méthode de préparation :

Mettre en suspension 65 grammes dans 1 litre d'eau pure. Porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute. Autoclaver à 115°C pendant 15 minutes.

- **Gélose NA :**

Na Cl.....	0,5%
Peptone	0,5%
Extrait de levure	0,2%

Extrait de viande	0,3%
Glucose	1%
Agar	2%

- **Gélose NA additionné de lait écrémé :**

Pour préparer le milieu gélose NA avec le lait écrémé il faut mélanger 800 ml de milieu NA gélosé liquide avec 200 ml de lait écrémé.

- **Gélose NA additionné de l'amidon :**

Na Cl.....	0,5%
Peptone	0,5%
Extrait de levure	0,2%
Extrait de viande	0,3%
Glucose	1%
Agar	2%
Amidon.....	0,5%

Méthode de préparation :

Mettre en suspension les ingrédients dans l'eau pure .porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

- **Gélose YPD (Yeast Peptone Dextrose):**

Dextrose (Glucose)	2%
Peptone.....	2%
Extrait de levure	1%
Agar	1,5% – 2%

(pH final à 25°C : 5,6± 0,2)

Méthode de préparation :

Mettre en suspension les ingrédients dans l'eau pure .porter le milieu à ébullition sous agitation constante pendant au moins 1 minute. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

- **YMA (Yeast Mannitol Agar) :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Mannitol	5g
Phosphate dipotassium	0,248g
Na Cl.....	0,1 g

Annexe

Sulfate de magnésium.....	0,2g
Extrait de levure	0,5g
Agar	18g

(pH final à 25°C : 6,8 ± 0,2)

- **Gélose MRSs (DeMan, Rogosa, Sharpe, Saccharose) :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Polypeptone	10g
Extrait de viande	10g
Extrait de levure.....	5g
Glucose.....	20g
Tween 80.....	1,08 g
Phosphate dipotassique	2g
Acétate de sodium	5g
Citrate d'ammonium	2g
Sulfate de magnésium	0,20 g
Sulfate de manganèse.....	0,05 g
Agar bactériologique	15 g
Saccharose	100g

(pH final à 25°C : 6.5 ± 0,2)

- **Bouillon MRS :**

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone	10g
Acétate de sodium	5g
Extrait de viande	10g
Sulfate de magnésium	0,10g
Extrait de levure	5g
Sulfate de manganèse	0,05g
Glucose.....	20g
Phosphate dipotassium	2g
Polysorbate 80.....	1g
Citrate d'ammonium	2g

(pH final à 25°C : 6.2± 0,2)

Méthode de préparation :

Suspendre 62.0 gramme dans 1 litre de l'eau distillée. Agiter bien et chauffer une minute jusqu'à la dissolution totales. Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

- **Solution Eau Peptonée :**

Na Cl.....	0,9 %
Peptone	1%

Annexe 2 : Les tests réaliser.

• **Test catalase :**

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

Technique :

Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur. Prélever une colonie à l'aide de l'anse dissocié la colonie dans la goutte.

Lecture :

Présence des Bulles d'oxygène ; La bactérie possède la catalase, elle est dite : **Catalase +**

Absence des bulles d'oxygène ; La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite : **Catalase-**

• **Coloration de gram :**

La répartition des bactéries en gram+ ou gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

Le colorant utilisé est le violet de gentiane qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. En raison de leur paroi de structure plus épaisse et de composition chimique particulière, les bactéries gram+ gardent la coloration violette. Les bactéries gram-, avec une paroi plus fine et plus perméable à la décoloration, perdent la couleur violette. De manière à visualiser les bactéries gram-, on recolore avec de la fuschine (rose). Les bactéries gram+ resteront violettes alors que les gram- seront maintenant teintées en rose.

Protocole :

1. Faire un frottis :

- Nettoyer une lame à l'alcool.
- Déposer une goutte d'H₂O sur la lame.
- Prélever une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine.
- Frotter l'anse dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

2. Coloration :

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé. Laisser agir 1 minute.

- Jeter l'excès de colorant puis rincer très brièvement en faisant couler de l'H₂O sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol et rincer brièvement à l'H₂O comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes). La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Rincer à l'H₂O.
- Contre-colorer en déposant la solution de fuschine (rose) pendant 1 minute puis rincer à l'H₂O. Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement x10 et x40 et avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement x 100).